

Série A, n° 3735

N° d'ordre 4586

THÈSES

présentées

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

par

Bernard LUBOCHINSKY

1^{re} THÈSE. - " Recherches sur les pyridine-nucléotidases animales. "

2^e THÈSE. - Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 30 Juin 1961 devant la Commission d'examen.

M. AUBEL

Président

M^{lle} LE BRETON

M. STOLKOWSKI

} *Examineurs*

Série A, n° 3735

N° d'ordre 4586

THÈSES

présentées

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

par

Bernard LUBOCHINSKY

1^{re} THÈSE. - " Recherches sur les pyridine-nucléotidases animales. "

2^e THÈSE. - Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 30 Juin 1961 devant la Commission d'examen.

M. AUBEL

Président

M^{lle} LE BRETON

M. STOLKOWSKI

} *Examineurs*

THÈSE

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

LE GÉNÉRAL DE LA FACULTÉ DES SCIENCES

DE LA FACULTÉ DES SCIENCES



PROFESSEURS

JULIA	T	Analyse supérieure et algèbre supérieure.	BRUSSET		Chimie minérale.
E BROGLIE	T	Théories physiques.	M. LEVY	T	Physique théorique des hautes Energies (ORSAY).
RENANT	T	Anatomie et Histologie comparées.	Mme CHAIX	T	Chimie biologique.
ERES	T	Mécanique des fluides et applications.	Mme HUREL-PY		Biologie Végétale (P.C.B.).
OURCART	T	Géographie physique et Géologie dynamique.	PIAUX	T	Chimie (S.P.C.N.).
LANTFOL	T	Botanique.	BRUN	T	Mécanique expérimentale des fluides.
RASSE	T	Evolution des êtres organisés.	LEDERER	T	Chimie biologique.
REVOST	T	Chimie organique.	Mme DUBREIL	T	Mathématiques (Agreg.).
DULIGAND	T	Analyse appliquée à la Géométrie.	Mme LELONG	T	Mathématiques (E.N.S.).
HAUDRON	T	Chimie appliquée.	BELLAIR	T	Géologie (S.P.C.N.).
YART	T	Minéralogie et Cristallographie.	COTTE	T	Physique (M.P.C.).
ESSIER	T	Zoologie.	DUBOIS J.E.	T	Chimie (M.P.C.).
ANGENOT	T	Biologie végétale (ORSAY).	LAMOTTE	T	Zoologie (E.N.S.).
UGER	T	Physique quantique et Relativité.	MICHEL André	T	Chimie Minérale (ORSAY).
ONNIER	T	Physiologie des Fonctions.	OLMER	T	Energétique générale.
VETEAU	T	Paléontologie.	ROUAULT	T	Physique.
OCARD	T	Physique (E.N.S.).	GAUTHIER	T	Mécanique appliquée.
ARTAN	T	Mathématiques (E.N.S.).	BARCHEWITZ	T	Chimie Physique.
AFFITTE	T	Chimie Générale.	BROSSEL	T	Physique atomique.
AVARD	T	Géométrie supérieure.	BUSER		Biologie végétale (P.C.B.).
DULOMB	T	Physique du Globe.	CAMUS		Biologie animale (P.C.B.).
le COUSIN	T	Biologie.	CASTAING	T	Physique (ORSAY).
HRETEN	T	Chimie minérale.	CURIEN	T	Minéralogie et Cristallographie.
RACH	T	Zoologie.	MOYSE	T	Chimie (ORSAY).
ASTLER	T	Physique (E.N.S.).	PANNETIER	T	Physiologie végétale (ORSAY).
HRUSSI	T	Génétique.	POSSOMPES	T	Biologie animale (P.C.B.).
VIERE	T	Géologie (Orsay).	PULLMANN		Chimie théorique.
AUTHERET	T	Biologie (P.C.B.).	TEILLAC	T	Physique Nucléaire et Radioactivité (ORSAY).
JCAS R.	T	Recherches Physiques.	TONNELAT		Biologie physico-chimique.
OMAS A.	T	Biologie cellulaire.	VILLE	T	Econométrie.
KNULF	T	Optique appliquée.	WILLEMART		Chimie (P.C.B.).
ORAND	T	Physique Enseignement.	DODE	T	Chimie (ORSAY).
ILLET	T	Physique (P.C.B.).	FREYMANN	T	Physique (S.P.C.N.).
RTIER	T	Mécanique expérimentale des Fluides	GUINOCHE	T	Biologie végétale (ORSAY).
ANJON	T	Astronomie.	ROLLET	T	Chimie (P.C.B.).
TIT	T	Biologie maritime.	Mle JOSIEN	T	Chimie (P.C.B.).
JENEY	T	Météorologie et dynamique atmosphérique.	CHEVALLEY	T	Géométrie algébrique et théorie des groupes.
LLIEN	T	Embryologie.	ARNOULT	T	Electronique (ORSAY).
CHHORN	T	Biologie Végétale (P.C.B.).	CHAPELLE	T	Physique (ORSAY).
e CUGNAC	T	Biologie Végétale (S.P.C.N.).	DELANGE	T	Mathématiques (ORSAY).
e CAUCHOIS	T	Chimie Physique.	DENY	T	Mathématiques générales (ORSAY).
IELLIER	T	Physique du Golbe.	GERMAIN	T	Mécanique théorique des fluides.
HERITIER	T	Biologie Générale (ORSAY).	LUCAS G.		Géologie.
JIVET	T	Radioélectricité (ORSAY).	ALLARD	T	Chimie physique.
INCIN	T	Mécanique Générale.	BERTHELOT	T	Physique fondamentale des hautes énergies (ORSAY).
JBREIL	T	Arithmétique et Théorie des Nombres .	BRICARD	T	Météorologie.
JELET	T	Chimie Organique.	Mle ALBE-FESSARD		Psychophysiologie.
IGNIARD	T	Géophysique appliquée.	FRIEDEL		Physique des solides (ORSAY).
IAMPETIER	T	Chimie Macromoléculaire.	M. JULIA		Chimie organique structurale.
IVILLIER	T	Micropaléontologie.	LENDER		Biologie animale (S.P.C.N.) (ORSAY).
NG	T	Pétrographie.	MAGAT		Physico-chimie des rayonnements.
ILLAT	T	Microscopie et diffraction électronique.	Mle QUINTIN	T	Electrochimie.
EMANN	T	Chimie organique et structurale.	MONOD	T	Biochimie cellulaire.
COQUINOT	T	Spectroscopie (ORSAY).	BENOIT	T	Physiologie animale (ORSAY).
SSY	T	Physique de l'Atmosphère.	DE POSSEL	T	Analyse numérique.
STOUCHES	T	Théories Physiques.	CHARLOT	T	Chimie analytique.
UVOST	T	Géologie.	HAISSINSKY	T	Radiochimie.
NIEL	T	Chimie des Solides.	LEMEE	T	Physiologie (B.M.P.V.) (ORSAY).
OCART	T	Minéralogie et cristallographie.	GUERIN	T	Chimie (ORSAY).
M. MATHIEU	T	Recherches Physiques.	CHATELET M.		Chimie (P.C.B.).
UTEAUX	T	Biologie Animale (P.C.B.).	JEAN		Physique (ORSAY).
AY	T	Zoologie (ORSAY).	MATTLER	T	Physique (ORSAY).
OUQUET	T	Théorie des fonctions et Topologie.	MICHEL Louis		Chimie (P.C.B.).
LDMANN	T	Biologie Végétale (P.C.B.).	RUMPF		Physique théorique (ORSAY).
INIER	T	Physique des Solides (ORSAY).	BERGERARD		Biologie animale (S.P.C.N.) (ORSAY).
ST	T	Physiologie comparée.	BERTEN		Electronique (ORSAY).
RTET	T	Calcul des Probabilités.	BOUSSIÈRES		Chimie des radioéléments (ORSAY).
HWARTZ	T	Calcul différentiel et intégral.	Mme COUTURE		Thermodynamique et mécanique physique.
OUARD	T	Physiologie Végétale.	ELLENBERGER		Géologie appliquée.
ALAVARD	T	Aviation (Technique aéronautique)	FRANC		Biologie animale (P.C.B.).
ELOT	T	Calcul différentiel.	SCHNELL		Botanique tropicale (ORSAY).
IRMANT	T	Synthèse organique générale.	STOLKOWSKI		Physiologie générale.
NARD	T	Chimie (E.N.S.C.P.).	ACHER		Chimie biologique (ORSAY).
VAT	T	Botanique (E.N.S.).	BAUDOIN		Biologie.
GUE	T	Statistiques Mathématiques.	BEAUMONT		Biologie animale.
ULAIRAC	T	Psychophysiologie.	BLAMONT		Géophysique Ionosphère.
RICH	T	Physiologie Végétale (E.N.S.).	BOURREAU		Biologie végétale (S.P.C.N.) (ORSAY).
ARECHAL	T	Optique théorique et appliquée.	CURIE D.		Physique (M.G.P.).
RRMANN	T	Théories Chimiques.	DURAND-DELGA		Géologie.
ADEFAUD	T	Botanique.	FRON		Chimie organique (ORSAY).
e LE BRETON	T	Physiologie.	HELLER		Physiologie végétale.
LEM	T	Mathématiques générales.	TORTRAT		Calcul des probabilités.
LONG	T	Mathématiques générales.	CAILLEUX		Géologie (S.P.C.N.).
VILLERS	T	Anatomie et Histologie comparées.	MAGNAN	T	Physique (P.C.B.).
RESMANN	T	Topologie Algébrique.	DAUDEL		Mécanique ondulatoire appliquée à la chimie théorique et à la physique nucléaire.
ANÇON	T	Physique (S.P.C.N.).	Mle FOURCROY		Biologie végétale (S.P.C.N.).
ANGEAUD	T	Géographie physique et Géologie dynamique.	BARRAUD		Physiologie cellulaire.
DEMENT	T	Mathématiques (M.P.C.).	NOIROT		Evolution des êtres organisés.
OT	T	Calcul des Probabilités.	Mme FOURES-BRUHAT	T	Mécanique analytique et mécanique céleste.
CH	T	Géologie.	Mle VEIL		Physiologie générale.
HATZMAN	T	Astrophysique.	LWOFF	T	Microbiologie.
RMIER	T	Paléontologie stratigraphique.	SIESTRUNCK	T	Mécanique physique et expérimentale.
MANSKY	T	Mathématiques générales.	LACOMBE		Métallurgie (ORSAY).
NNUIER	T	Physique (P.C.B.).	BROCHARD	T	Physique (P.C.B.) (ORSAY).
ZET	T	Génétique (ORSAY).	CABANNES	T	Mécanique générale.
UTHIER	T	Géologie appliquée.	LESIEUR	T	Mathématiques (M.P.C.) (ORSAY).
ne TONNELAT	T	Relativité.	MAZET	T	Mécanique générale (ORSAY).
KMIER	T	Mathématiques (M.P.C.).			
UCHAY	T	Chimie (P.C.B.).			
BRAIN	T	Electrotechnique générale.			

La partie essentielle des recherches décrites dans ce mémoire a été effectuée à l'Institut de Biologie Physico-Chimique, dans le Service de Biochimie dirigé par Monsieur le Professeur E. AUBEL à qui je tiens à exprimer ici ma profonde reconnaissance pour sa bienveillance, ses judicieux conseils et la chaleur de ses encouragements.

Je remercie Monsieur le Professeur J. STOLKOWSKI pour l'invitation si cordiale qu'il m'a faite de poursuivre mes recherches dans le laboratoire de Physiologie Chimique de la Faculté des Sciences. Depuis l'origine même de ce travail, plus d'un résultat porte la marque de l'intérêt qu'il n'a cessé d'y porter.

J'exprime ma plus vive reconnaissance à Mademoiselle LE BRETON, Professeur à la Faculté des Sciences, qui a bien voulu faire partie du jury et qui m'a témoigné beaucoup de bienveillance.

Mes remerciements vont également à Monsieur le Professeur A.J. ROSENBERG qui m'a initié aux techniques modernes et fait bénéficier de sa connaissance des problèmes de biochimie.

Si je pense plus particulièrement à mon ami J.P. ZALTA, je n'oublie pas pour autant mes camarades et collaborateurs de l'Institut de Biologie Physico-Chimique et du laboratoire de Physiologie Chimique. Leur aide efficace tient une large place dans le concours des événements qui, depuis le début de mes études à la Faculté de Pharmacie de Paris, a permis ma formation de chercheur.

J'exprime également ma reconnaissance à Monsieur le Professeur LEMOIGNE, Membre de l'Institut, qui a bien voulu parrainer mes recherches.

Je rappellerai enfin que le Centre National de la Recherche Scientifique a rendu ce travail possible grâce à l'attribution d'une allocation d'Attaché de Recherches.

S O M M A I R E

=====

Introduction	1
<u>Chapitre 1 : Origine et rôle des pyridine-nucléotides</u>	2
Structure	6
Rôle biologique des PN	9
Biosynthèse des PN	10
Catabolisme des PN	13
Les pyridine-nucléotidases	15
<u>Chapitre 2 : Matériel et technique utilisés</u>	23
Méthode de dosage	24
Préparation des poudres acétoniques	32
<u>Chapitre 3 : Etude de la TPN-ase du foie de Pigeon et de Rat</u>	37
Synthèse du TPN par un extrait de foie en présence de cortisone	37
Hydrolyse du TPN par un extrait de foie en présence de cortisone	41
Expériences montrant l'existence de deux enzymes spécifiques	44
Etude de l'activateur de la TPN-ase	49
Recherches préliminaires sur les propriétés de l'activateur	51
Purification partielle de la TPN-ase du foie de Pigeon	62
Propriétés de l'enzyme	64
Particularités concernant la TPN-ase du foie de Rat	73
Résumé	81
<u>Chapitre 4 : Problèmes de solubilisation et recherche d'une autre source d'enzyme</u>	83
Les pyridine-nucléotidases des foies de Rat et de Mouton	84
Les pyridine-nucléotides des érythrocytes	86
Les pyridine-nucléotides du sperme de Taureau	92
Résumé	93
<u>Chapitre 5 : Etude de l'activité pyridine-nucléotidasique du sperme</u>	95
Essais de ségrégation des pyridine-nucléotidases des vésicules séminales	96
Recherche des meilleures conditions de purification	105
Purification de la PN-ase du sperme	113
Propriétés de la PN-ase du sperme	117
Résumé	127
Conclusion	129
Bibliographie	133

Liste des abréviations et des sigles utilisés

DPN ou DPN ⁺	diphosphopyridine-nucléotide
TPN ou TPN ⁺	triphosphopyridine-nucléotide
DPNH	diphosphopyridine-nucléotide réduit
TPNH	triphosphopyridine-nucléotide réduit
NMN	nicotinamide-mononucléotide
NR	nicotinamide-riboside
désamido-DPN	analogue nicotinique du DPN
désamido-NMN	analogue nicotinique du NMN
INH	hydrazide de l'acide isonicotinique
ATP	acide adénosine-5'-triphosphorique
PRPP	1'-phosphoribosyl-5'-pyrophosphate
PP	pyrophosphate
DEAEC	diethylaminoéthylcellulose
Tris	tri (hydroxyméthyl) aminométhane
DPN-ase	diphosphopyridine-nucléotidase
TPN-ase	triphosphopyridine-nucléotidase
PN-ase	pyridine-nucléotidase.

I N T R O D U C T I O N

=====

Un des problèmes les plus attachants de la Biochimie est celui de la régulation du métabolisme. En ce qui concerne les animaux supérieurs, il est indiscutable qu'il faille envisager dans ce phénomène le rôle des hormones et du système nerveux. Mais, en outre, il est clair que d'autres mécanismes régulateurs, de nature différente, existent et que l'on retrouve aussi dans les organismes unicellulaires. Ces mécanismes permettent le ralentissement ou l'accélération de telle réaction chimique au profit de telle autre, déterminant ainsi un certain équilibre dynamique compatible avec la croissance et la multiplication de la cellule.

L'exemple de régulation le plus connu est celui qu'a montré PASTEUR : en présence d'oxygène, la croissance et la multiplication des levures s'effectuent avec une moindre consommation de glucose qu'en l'absence d'oxygène. L'énergie nécessaire aux synthèses biologiques provient de voies métaboliques différentes dans chacun des deux cas, et puisque chaque réaction est catalysée par une enzyme spécifique, la régulation du métabolisme en dernière analyse s'exprime en termes d'activités enzymatiques.

L'activité enzymatique dépend de multiples facteurs, en particulier de la présence de certains coenzymes. De très nombreuses enzymes sont inactives en l'absence de coenzymes, pyridine-nucléotides ou flavine-nucléotides par exemple, pour ne citer que les déshydrogénases. La quantité de ces transporteurs d'hydrogène, leur proportion relative, leur répartition au sein des différentes phases et structures intracellulaires, influencent l'activité d'une enzyme ou d'un système enzymatique donné.

Le métabolisme particulier des coenzymes interfère avec le métabolisme général puisqu'il en dépend pour ce qui est de certains substrats et de l'énergie nécessaire à leur synthèse. De même, le métabolisme général subit l'influence de tous les facteurs qui agissent sur le métabolisme des coenzymes et modifient leur vitesse de synthèse ou de dégradation, leur état d'équilibre. Nous avons là une régulation située à un autre niveau.

Au cours de ce travail j'ai voulu apporter ma contribution à l'étude des facteurs qui conditionnent les concentrations du diphosphopyridine-nucléotide et du triphosphopyridine-nucléotide. Plus particulièrement, j'ai examiné la dégradation enzymatique de ces nucléotides et mis en évidence leur hydrolyse par des pyridine-nucléotidases non spécifiques ou au contraire spécifiques pour chacun d'entre eux.

A l'origine de ces recherches se situent les expériences réalisées par STOLKOWSKI et REINBERG (1956 et 1957) sur les échanges de potassium dans des organes isolés, maintenus en survie. Les résultats obtenus en présence de corticostéroïdes conduisent à penser que l'action de ces hormones sur le potassium cellulaire peut être le contre-coup d'une modification interne de l'équilibre acide-base. Cet équilibre pouvant lui-même dépendre de la concentration en ion hydrogène libre dans les tissus, il était permis de se demander, à titre d'hypothèse de travail, si l'action des corticoïdes interfère avec le métabolisme des transporteurs d'hydrogène; dans une optique un peu différente, TALALAY et WILLIAMS-ASHMAN (1958) ont montré que certains hydroxystéroïdes peuvent jouer un rôle catalyseur dans les réactions de transfert de l'hydrogène entre les pyridine-nucléotides.

Mes tentatives pour vérifier l'hypothèse de travail n'ont pas complètement abouti. Les corticostéroïdes ont bien une influence sur la dégradation du triphosphopyridine-nucléotide dans le foie; mais leur action, semble-t-il n'est pas directe; par contre les expériences réalisées m'ont permis de trouver une enzyme spécifique de cette dégradation, enzyme qui, pour fonctionner requiert la présence d'un cofacteur. Les travaux entrepris ont en outre abouti à la purification poussée d'une autre enzyme de dégradation des pyridine-nucléotides.

.....

L'ensemble des connaissances acquises dans l'anabolisme et la catabolisme des coenzymes est résumé dans le premier chapitre, qui situe le problème au moment où ce travail a été commencé.

La préparation des matières premières, les techniques utilisées pour les dosages, font l'objet du deuxième chapitre.

Le chapitre III est consacré à la purification partielle de la triphosphopyridine-nucléotidase du foie de Pigeon et de l'activation. Les principales propriétés physico-chimiques de l'enzyme du foie de Pigeon y sont décrites ainsi que les propriétés particulières de l'enzyme du foie de Rat.

Le chapitre IV expose les recherches consacrées au problème de la solubilisation des di- et triphosphopyridine-nucléotidases du foie et des érythrocytes de divers animaux et la mise en évidence d'une quantité considérable de pyridine-nucléotidase en solution naturelle dans le plasma spermatique du Taureau.

La purification, l'étude cinétique et celle des propriétés physico-chimiques de la pyridine-nucléotidase non spécifique du sperme de Taureau sont décrites dans le chapitre V.

Enfin, la conclusion contient les remarques qui peuvent être dégagées de l'ensemble de ce travail.

Chapitre I

ORIGINE ET ROLE DES PYRIDINE-NUCLEOTIDASES

Les pyridine-nucléotides comptent parmi les cofacteurs qui ont été le plus étudié. Depuis leur découverte, la liste des réactions enzymatiques dans lesquelles ils interviennent comme accepteur ou donneur d'hydrogène s'allonge chaque année de plusieurs unités. Il n'est pas de chapitre important de l'étude du métabolisme qui ne mette en évidence le rôle de l'une ou l'autre de ces nucléotides sous leur forme oxydée ou réduite.

L'étude de la fermentation alcoolique a permis à HARDEN et YOUNG (1906) de mettre en évidence la cozymase encore appelée coenzyme I ou diphosphopyridine-nucléotide, cofacteur des déshydrogénases de la glycolyse. Le cofacteur de la glucose-6-phosphatédéshydrogénase, découvert par WARBURG et CHRISTIAN (1931) et appelé coenzyme II, est le triphosphopyridine-nucléotide; c'est également le coenzyme de la 6-phosphogluconate déshydrogénase, autre enzyme de la voie oxydative de dégradation du glucose aboutissant à la formation du ribose nécessaire à la synthèse des nucléotides.

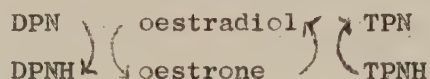
Dans le cycle des acides tricarboxyliques, ou cycle de KREBS, l'un ou l'autre des nucléotides intervient dans trois réactions différentes (KREBS et JOHNSON, 1937; STRAUB, 1942, OCHOA, 1948).

On retrouve encore ces cofacteurs dans le catabolisme et l'anabolisme des acides gras (STERN, 1957; LANGDON, 1957; WAKIL et GANGULY, 1959), dans les réactions d'oxydation et de synthèse de certains acides aminés (UDENFRIED et COOPER, 1952; OLSON et ANFISEN, 1952).

Au cours de la phosphorylation oxydative, le diphosphopyridine -

nucléotide réduit est le point de départ d'une suite de réactions liées à l'accumulation de l'énergie nécessaire aux synthèses; son oxydation aérobie dans les mitochondries du foie (LEHNINGER, 1951) permet la synthèse de l'adénosine-triphosphate. C'est le triphosphopyridine-nucléotide réduit que l'on retrouve lors des réactions de carboxylation réductives (OCHOA et coll., 1948, 1950).

La synthèse de cholestérol à partir de l'acétate (BUCHER et coll., 1953) et les diverses transformations subies par ce corps pour aboutir aux corticostéroïdes se font également avec la participation des pyridine-nucléotides. Enfin, le rôle de certaines hydroxystéroïdes-déshydrogénases que TALALAY et WILLIAMS-ASHMAN (1958) font intervenir dans l'équilibre entre les formes réduites et oxydées des deux pyridine-nucléotides est particulièrement intéressant :



Il y a là une imbrication dans l'équilibre de deux sortes de cofacteurs, pyridine-nucléotides et hydroxystéroïdes, aux rôles métabolique et physiologique très différents par ailleurs; cette imbrication ajoute encore à la complexité des mécanismes régulateurs dans lesquels interviennent le diphosphopyridine-nucléotide et le triphosphopyridine-nucléotide.

Structure moléculaire des pyridine-nucléotides.

La connaissance de la structure des pyridine-nucléotides résulte pour l'essentiel des travaux effectués parallèlement par WARBURG (1935 a et b), EULER (1936-1937) et leurs collaborateurs, après que MYRBACK (1933) eût montré la présence d'un reste adénylique dans la molécule.

C'est à WARBURG et CHRISTIAN (1936) que l'on doit la mise en évidence d'un troisième radical phosphoryle dans la molécule de ce qu'ils appellent, pour cette raison, le triphosphopyridine-nucléotide, par opposition au diphosphopyridine-nucléotide.

En 1942, SCHLENK résume l'ensemble des certitudes fondées sur

l'analyse élémentaire, l'isolement, la caractérisation des constituants et la dégradation systématique de la molécule pour justifier la formule du diphosphopyridine-nucléotide.

L'incertitude concernant la position du troisième groupe phosphorique dans la molécule du triphosphopyridine-nucléotide n'a été levée que ces dernières années par l'utilisation d'une série d'enzymes spécifiques. En particulier, des phosphatases ont permis à KORNBERG et PRICER (1950) d'isoler une fraction identique du point de vue chromatographique, à l'acide adénylique α . Le dernier groupe phosphorique ne pouvait donc être situé que sur le carbone 2' et 3' du ribose lié à l'adénine; les recherches ultérieures de KYHM et coll. (1953) l'ont définitivement situé à 2'.

Enfin, la liaison glycosidique du ribose avec l'adénine d'une part et du ribose avec la nicotinamide d'autre part, peut, dans chaque cas, donner naissance à deux stéréoisomères, soit au total quatre stéréoisomères possibles. Dans la partie adénosine, la liaison du ribose avec le carbone 9 de l'adénine est toujours du type β glycosidique (BADDILEY, 1955). Par contre, dans le diphosphopyridine-nucléotide d'origine biologique, la liaison nicotinamide-ribose se présente sous les deux formes α et β glycosidiques. C'est de cette caractéristique qu'il s'agit lorsque l'on parle de l' α ou du β diphosphopyridine-nucléotide. KAPLAN et ses coll. (1955), après action de la diphosphopyridine-nucléotidase extraite de Neurospora crassa, isolent, du milieu de réaction, une fraction de substrat non hydrolysé. L'analyse révèle qu'il s'agit de l' α diphosphopyridine-nucléotide. Seule, la forme β est hydrolysable par l'enzyme, comme elle est, par ailleurs, la seule active dans les réactions enzymatiques requérant la présence de ce cofacteur.

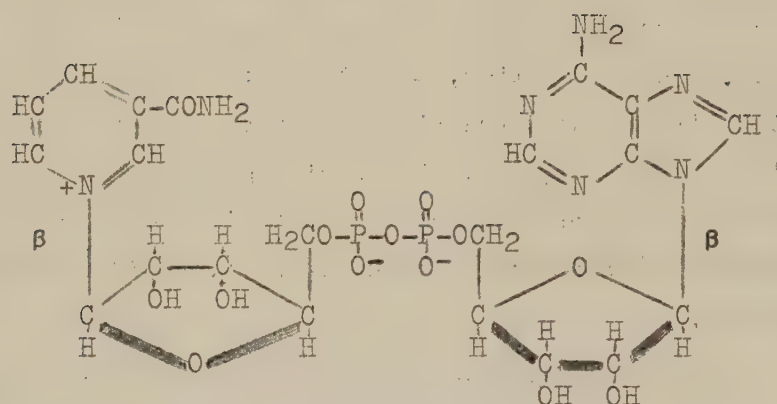
Aucune détermination systématique du caractère des liaisons glycosidiques dans le triphosphopyridine nucléotide, n'a, à notre connaissance, été effectuée. Les liaisons β sont implicitement admises par les auteurs, par analogie avec celles du diphosphopyridine-nucléotide.

Tout récemment, TODD (1958) a réalisé la synthèse chimique des pyridine-nucléotides à partir de leurs constituants.

En définitive, les pyridines-nucléotides sont des dinucléotides, dont les bases sont la nicotinamide et l'adénine. Les formules développées sont représentées à la page suivante.

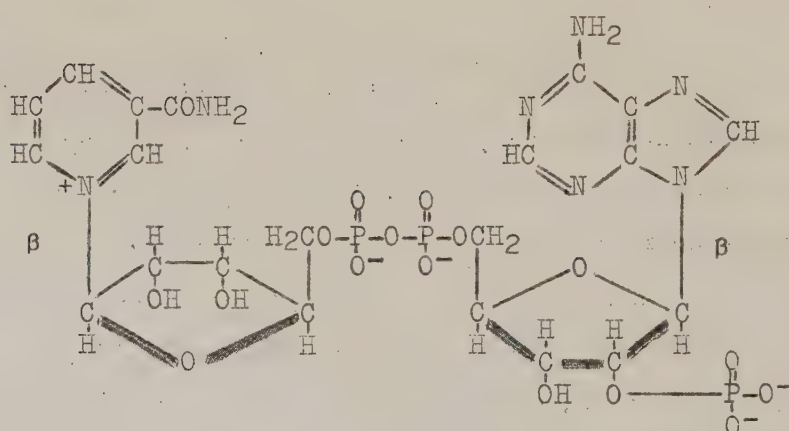
.....

Formule I



DIPHOSPHOPYRIDINE-NUCLEOTIDE . (DPN, CO I)

Formule II



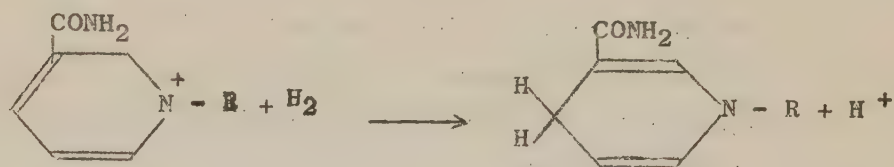
TRIPHOSPHOPYRIDINE-NUCLEOTIDE (TPN, CO II)

Rôle biologique des pyridine-nucléotides

En tant que cofacteurs de nombreuses déshydrogénases, le DPN et le TPN sont des accepteurs d'électrons et d'hydrogène. Inversement, sous leur forme réduite, ils sont des donateurs d'électrons et d'hydrogène.

Depuis les travaux de WARBURG (1935 - 1936) et de KARRER (1938), les modifications de la nicotinamide, plus précisément de la liaison nicotinamide-ribose dans la molécule des pyridine-nucléotides, sont connues : lors de leur réduction l'azote pentavalent est ramené à l'état trivalent et la nicotinamide fixe un atome d'hydrogène.

Puis, PULLMAN et coll. (1954) montrent que l'hydrogène accepté se fixe sur le carbone situé en para.

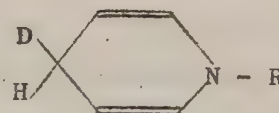


La fixation de cet hydrogène donne naissance à deux diastéréoisomères.

A cours de la réduction chimique du DPN, en présence d'eau lourde marquée au deutérium, les deux formes apparaissent en quantités égales



1 ou α



2 ou β

Lors de l'oxydation de l'alcool marqué par l'alcool-déshydrogénase, le deutérium fixé sur le DPN est en I ou β ; ce deutérium pourra être transféré sur l'acide pyruvique à l'aide de la lacticodéshydrogénase.

Au contraire, la triosephosphate-déshydrogénase (glycéraldéhyde-phosphate-déshydrogénase) transfèrera sur l'acide 1,3-diphosphoglycérique l'hydrogène situé en β , laissant le deutérium fixé sur la molécule de DPN. (Les symboles α et β employés dans ces cas sont évidemment sans rapport avec les mêmes symboles définissant la caractère des liaisons glycosidiques).

Biosynthèse des pyridine-nucléotides

Synthèse du DPN

La nicotinamide en tant que vitamine était connue bien avant sa mise en évidence dans la molécule des pyridine-nucléotides. Aussi, sa participation à leur synthèse semble-t-elle évidente. En fait, HANDLER et KOHN découvrent (1943) le rôle de l'acide nicotinique comme précurseur de la synthèse des pyridine-nucléotides par les érythrocytes d'origine humaine.

A partir de l'acide nicotinique, les réactions suivantes ont été mises en évidence, tant dans les érythrocytes d'origine humaine (PREISS et HANDLER, 1957) que dans la levure de boulangerie et le foie de Rat.

- (1) Acide nicotinique + PRPP $\rightleftharpoons$ désamido NMN + PP
- (2) ATP + désamido-NMN $\rightleftharpoons$ désamido DPN + PP
- (3) Désamido DPN + ATP + glutamine $\longrightarrow$ DPN + AMP + Glutamate + PP

Par ailleurs, une autre voie de synthèse, à partir de la nicotinamide, a été découverte dans les extraits de foie de divers animaux (ROWEN et KORNBERG, 1951).

- (4) Nicotinamide + Ribose -1- P + H⁺ $\rightleftharpoons$ nicotinamide-riboside + phosphate
- (5) Nicotinamide - riboside + ATP $\longrightarrow$ NMN + ADP
- (6) NMN + ATP $\rightleftharpoons$ DPN + PP

Cette dernière réaction a été mise en évidence aussi bien

dans le foie de porc que dans la levure (KORNBERG, 1950 a).

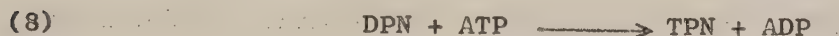
Il semble que le premier schéma proposé par HANDLER et ses collaborateurs représente au mieux ce qui se passe *in vivo*.

En effet, LANGAN et SHUSTER (1958) ont montré qu'après injection de nicotinamide radioactive à des souris, c'est le désamido-DPN marqué qui est d'abord synthétisé dans le foie; le DPN marqué se forme ensuite. Les auteurs expliquent ce fait par la nécessité d'une désamidation préalable à l'incorporation de la nicotinamide dans le DPN. Une autre remarque en faveur de la voie nicotinique résulte de la concentration élevée en nicotinamide (Constante de Michaelis ou K_s de l'ordre de 0,1M) nécessaire pour la synthèse du nicotinamide-riboside ou pour celle de NMN à l'aide d'une pyrophosphorylase spécifique (PREISS et HANDLER, 1957).

Enfin, cette NMN-pyrophosphorylase existe bien dans les érythrocytes, mais la DPN-pyrophosphorylase en est absente (MALKIN et DENSTEDT, 1956), le nicotinamide-mononucléotide formé ne peut donc être à l'origine du DPN des érythrocytes.

Synthèse du TPN

La seule voie de synthèse actuellement connue a été trouvée par EULER et VESTIN (1938) dans les extraits de levure. Le mécanisme en est simple : une kinase, purifiée par KORNBERG (1950 b) à partir de ces extraits catalyse le transfert d'un groupe phosphate, de l'ATP sur le DPN

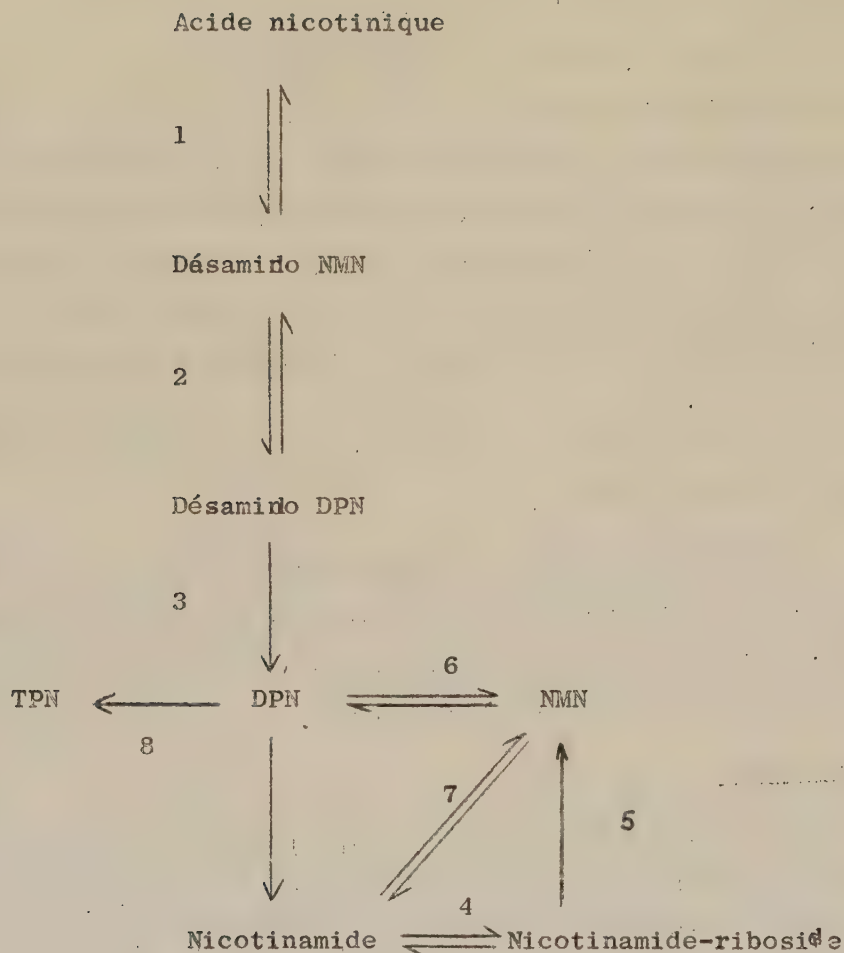


Une autre enzyme, aux propriétés semblables, a été purifiée par WANG (1953) à partir du foie de pigeon.

A l'aide de cette dernière kinase, très stable, la réaction est totale, tout le DPN se retrouve sous forme de TPN; la réaction n'est pas réversible puisqu'il y a transformation d'une liaison riche en énergie, en simple liaison ester.

L'ensemble des réactions précédentes est résumé dans le schéma I.

Schéma 1



En ne tenant compte que de cette seule donnée, il semble que la majeure partie des pyridine-nucléotides puisse se retrouver sous forme de TPN. En fait, tous les résultats connus vont à l'encontre de cette déduction; il y a en moyenne dans le foie et dans le sang, trois fois plus de DPN que de TPN (GLOCK et Mc LEAN, 1957; BISHOP et coll., 1959).

Il faut donc admettre un ou plusieurs mécanismes régulateurs tant au cours de la synthèse que lors de la dégradation de ces coenzymes. On peut par exemple envisager que la synthèse du TPN à partir du DPN est plus lente que la synthèse de ce dernier, dans ce cas le DPN s'accumule-

rait dans des proportions toujours plus grandes. Si le rapport $\frac{\text{DPN}}{\text{TPN}}$ se maintient constant, c'est qu'il y a une compensation au cours du catabolisme de ces deux cofacteurs.

Catabolisme des pyridine-nucléotides.

En même temps qu'ils découvraient le coenzyme I (DPN), HARDEN et YOUNG signalaient son inactivation par destruction enzymatique.

Depuis, le problème de la dégradation des pyridine-nucléotides s'est trouvé en grande partie résolu par la découverte, l'isolement et la purification de plusieurs enzymes.

Si nous ne considérons que les seules réactions directement possibles, sans nous préoccuper du sort des produits de scission, nous voyons qu'elles sont possibles en trois points pour chacun des pyridine-nucléotides (schémas 2 et 3).

L'hydrolyse au point (a) transforme le TPN en DPN; c'est en somme l'inverse de la réaction de synthèse. Aucune enzyme spécifique n'est connue pour cette réaction, mais KORNBERG et PRICER (1950), puis SANADI (1952) ont montré que diverses phosphatases alcalines l'effectuent. Les phosphatases sont évidemment sans action sur le DPN, puisque ce dernier coenzyme ne possède aucune liaison phosphate monoester.

L'hydrolyse au point (b) est propre au DPN sous les formes réduite et oxydée. Une désaminase purifiée à partir des extraits d'*Aspergillus* et spécifique des dérivés de l'adénine permet d'obtenir le désamino-DPN (*) (KAPLAN et coll., 1952). La même action n'est pas possible sur le TPN; la présence du troisième groupe phosphate situé près de l'adénine empêche la désamination.

Cette désaminase n'a pas été retrouvée chez les animaux.

Les hydrolyses aux points (a) et (b), bien qu'effectuées à l'aide d'enzymes non spécifiques, sont donc caractéristiques du TPN pour l'action des phosphatases, du DPN pour celle de la désaminase.

(*) désaminé sur l'adénine; à ne pas confondre avec l'analogue nicotinique désamidé sur la nicotinamide.

Schéma II, TPN

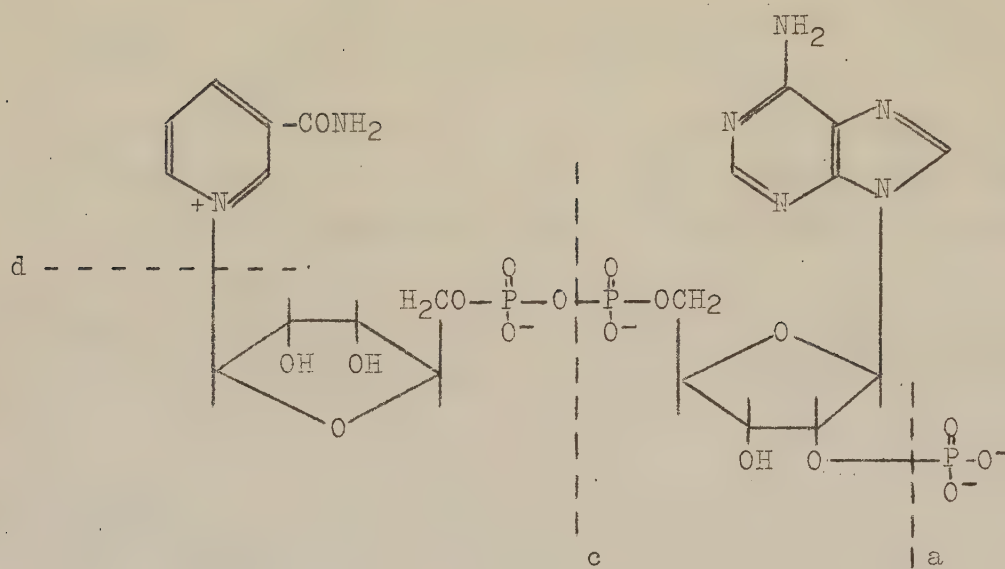
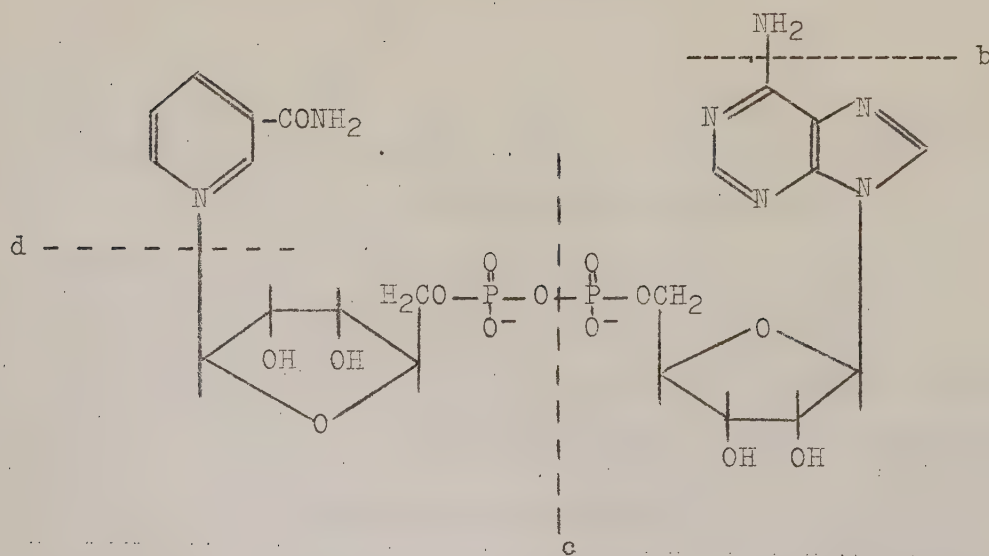


Schéma III, DPN



En ce qui concerne les autres points d'attaque, des enzymes agissant aussi bien sur le DPN que sur le TPN catalysent la scission en (c) et (d); il s'agit d'enzymes différentes : les nucléotide-pyrophosphatases et les pyridine-nucléotidases.

Les nucléotides-pyrophosphatases, non spécifiques, purifiées à partir des pommes de terre par SINGER et KEARNEY (1950) ou de venin de serpent par KORNBERG et PRICER (1950), hydrolysent la liaison pyrophosphate, libérant la nicotinamide-mononucléotide et l'adénosine-5'-phosphate, pour le DPN, ou l'adénosine-2',5'-diphosphate, pour le TPN.



Sous l'action des nucléotide -pyrophosphatases, les pyridine-nucléotides réduits donnent naissance à la nicotinamide-mononucléotide réduite. Bien que non isolée, une pyrophosphatase active a été signalée par SHUSTER et coll. (1951) dans la préparation de phosphatase intestinale décrite par SCHMIDT et THANNHAUSER (1943).

Nous ne rappellerons que pour mémoire la réversibilité de la synthèse du diphosphopyridine-nucléotide à partir de la nicotinamide-mononucléotide et de l'adénosine-triphosphate. Cette dégradation ne semble pas réalisable dans les conditions physiologiques.

Les pyridine-nucléotidases.

Nous groupons sous cette appellation les enzymes de diverses origines, qui diffèrent entre elles par certaines propriétés mais dont la caractéristique commune est d'hydrolyser la liaison nicotinamide-ribose des pyridine-nucléotides.

Dans leurs publications sur le cofacteur thermostable de la fermentation alcoolique, HARDEN et YOUNG (1906 a et b) signalent la labilité de la cozymase dans les jus de levure.

La dégradation du diphosphopyridine-nucléotide par les broyats ou des extraits de divers tissus devait à plusieurs reprises être signalée par les auteurs. Les premiers travaux qui peuvent se rapporter à l'hydrolyse de la liaison nicotinamide-ribose sont, à notre connaissance,

ceux de LENNERSTRAND (1936,) et ceux de EULER et HEIWINKEL (1937); mais ce sont MANN et QUASTEL, en 1941, qui, mettent, les premiers, en évidence, dans le cerveau de Rat une des propriétés particulières de ce qu'ils appellent la cozymase-nucléotidase, à savoir son inhibition par la nicotinamide.

En 1940, KOHN et KLEIN étudient la synthèse du facteur V par les érythrocytes humains. Ils constatent :

1°) que l'acide nicotinique favorise la synthèse du facteur de croissance d'*Hemophilus parainfluenzae*,

2°) que le DPN et le TPN peuvent remplacer ce facteur de croissance,

3°) que dans le sang hémolysé un système thermolabile détruit le facteur.

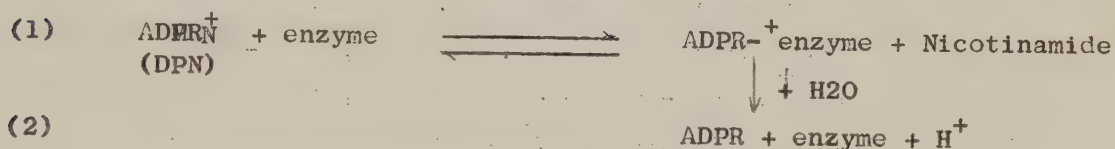
Ces remarques permettent à HANDLER et KLEIN (1942 a et b) de préciser le mode d'action de la cozymase-nucléotidase des tissus animaux, ils démontrent que c'est la liaison nicotinamide-ribose qui est hydrolysée et confirment que cette hydrolyse est inhibée par la nicotinamide.

Le premier travail d'ensemble, publié en 1949 est dû à Mc ILWAIN et RODNIGHT. Ils y montrent que la diphosphopyridine-nucléotidase hydrolyse le DPN comme le TPN, ce dernier toutefois avec une vitesse moindre. Par contre, les formes réduites, DPNH et TPNH, ne sont pas hydrolysées. L'enzyme est sans action sur les dérivés de la nicotinamide, nicotinamide-riboside et nicotinamide-mononucléotide. Malgré leurs efforts, Mc ILWAIN et RODNIGHT ne peuvent solubiliser l'enzyme, toutes leurs expériences sont effectuées à l'aide de tranches ou de broyats de cerveau. La même difficulté se retrouvera pour ALIVISATOS et coll., (1952, 1956) et pour MALKIN et DENSTEDT (1956) qui étudient la "diphosphopyridine-nucléotide-nucléotidase" des érythrocytes de lapin : l'enzyme est fermement liée au stroma, ce qui rend impossible toute purification. Ils retrouvent dans l'ensemble les mêmes résultats que ceux obtenus à l'aide des broyats de cerveaux, les seules différences notables concernant l'affinité de l'enzyme pour le TPN et son activité sur la nicotinamide-mononucléotide.

Un autre résultat intéressant a été obtenu par KAPLAN et coll.

(1951). Ils ont réussi à purifier à partir du Neurospora crassa une enzyme qui hydrolyse également la liaison nicotinamide-ribose. Le Neurospora est une source particulièrement riche en pyridine-nucléotidase soluble, surtout après culture en milieu carencé en zinc (NASON et coll., 1951). L'enzyme purifiée hydrolyse à la fois le DPN et le TPN avec la même vitesse. Sa propriété la plus remarquable est d'être particulièrement difficile à inhiber par la nicotinamide : il faut une concentration de l'ordre de 1.45×10^{-1} M pour inhiber 50 p. 100 de l'activité enzymatique, tandis que des concentrations 100 fois moindres suffisent pour les pyridine-nucléotidases du cerveau, du foie, des érythrocytes.

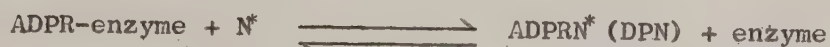
Cette différence dans l'inhibition, par la nicotinamide, des enzymes d'origine animale ou provenant du Neurospora est à l'origine d'une autre série de travaux de l'école de KAPLAN. En 1953, ZATMAN et coll. étudient l'action de la nicotinamide sur la diphosphopyridine-nucléotidase de la rate de Boeuf; ils s'aperçoivent que l'inhibition apparemment non compétitive n'en est pas moins réversible. Ils envisagent donc une réaction d'hydrolyse en deux étapes successives :



La réaction (1) est réversible; l'énergie contenue dans la liaison "onium" entre la nicotinamide et le ribose, est conservée dans la liaison ADPR-enzyme; c'est l'hydrolyse (2), irréversible, de cette liaison qui est inhibée compétitivement par la nicotinamide, dans le cas de la DPN-ase de rate de boeuf.

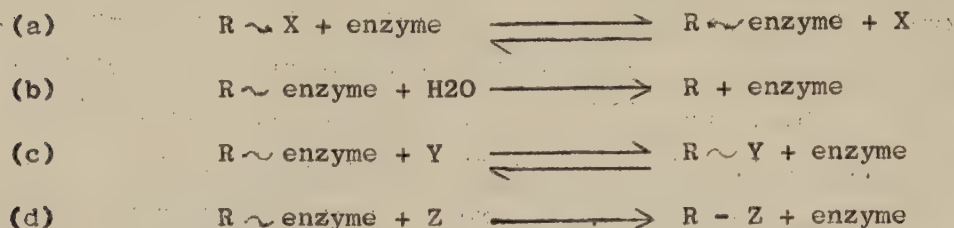
ZATMAN et coll. expérimentent en présence de nicotinamide marquée par ^{14}C pour vérifier l'hypothèse concernant la réaction (1).

Après incubation et isolement des produits de la réaction, ces auteurs retrouvent du DPN contenant de la nicotinamide radioactive.



Ce résultat confirme par ailleurs la théorie de LANGENBECK

(1933) selon laquelle l'énergie de certaines liaisons "riches" pouvait être conservée dans des complexes formés avec l'enzyme.



Si Y est identique à X, on ne s'aperçoit pas de l'échange à moins d'utiliser des éléments radioactifs; si Y est différent on aboutit à la formation d'un nouveau corps $R \sim Y$ (c) ou $R - Z$ (d) conservant ou non la liaison "riche".

La réaction de transfert effectuée par la diphosphopyridine-nucléotidase de la rate a été retrouvée par de nombreux auteurs; cette enzyme est parfois appelée pour cette raison pyridine-transglycosidase. On a ainsi abouti à la formation de nombreux analogues du DPN, dans lesquels la nicotinamide est remplacée par toute une série de dérivés de la nicotinaeide ou de l'imidazole; nous citerons comme substituants l'acide nicotinique (LAMBORG et coll., 1958), l'acide isonicotinique et son hydrazide (ZATMAN et coll., 1954 a), le 3-acétylpyridine (KAPLAN et CIOTTI, 1954), la 4-amino-5-carboxamidoimidazole (ALIVISATOS et WOOLLEY, 1955) et l'histamine (ALIVISATOS et coll., 1960).

La possibilité de former un analogue du DPN et l'activité antituberculeuse de l'INH orientent les recherches de ZATMAN et coll. (1954 b) vers l'étude de son action sur la DPN-ase. Ces auteurs constatent que l'INH est un inhibiteur de l'enzyme de la rate de boeuf dix fois plus puissant que la nicotinamide; l'enzyme de la rate de porc n'est par contre, inhibée, dans les mêmes proportions que par des concentrations 100 fois plus élevées d'INH. Une autre constatation ressort des dosages : lorsque l'enzyme n'est pas inhibée il y a formation d'un analogue du DPN; lorsque l'enzyme est inhibée, il n'y a pratiquement pas d'analogue formé. La même équipe de chercheurs (1954 b) a ainsi pu classer des DPN-ases de différentes origines animales suivant leur "sensibilité" à l'INH; le classement est indépendant de la nature du tissu essayé; pour un animal donné, l'enzyme est "sensible" ou non. La rate,

le cerveau d'Agneau et de Chèvre ont des enzymes "sensibles" comme celles du boeuf; les mêmes organes chez le Rat, le Lapin, la Souris possèdent des enzymes "insensibles". La prostate et la rate de l'homme sont de même "insensibles" à l'INH.

Les réactions d'échange entre la nicotinamide ou l'INH et le DPN ne sont pas parallèles puisque l'échange qui se fait normalement avec la nicotinamide radioactive en présence de cerveau de Boeuf est inhibé si l'on ajoute de l'INH au milieu d'incubation.

La conclusion de cet intéressant travail est que l'activité transglycosidasique des DPN-ases animales doit être en relation avec leur activité physiologique. Les auteurs avancent l'hypothèse d'un analogue du DPN, précurseur de la synthèse du DPN en présence de nicotinamide et de DPN-ase. Aucune recherche ultérieure n'est venue confirmer cette hypothèse valable mais qui nécessiterait d'autres informations sur l'activité transglycosidasique dont beaucoup de DPN-ases semblent dépourvues.

Tous les auteurs cités, sauf KAPLAN et coll. (1951), travaillent avec des enzymes d'origine animale, très peu purifiées et non solubilisées; dans tous ces travaux on considère l'hydrolyse du diphosphopyridine-nucléotide et du triphosphopyridine-nucléotide comme résultant de l'action de la DPN-ase. Les DPN-ases animales sont-elles insolubles et faut-il définitivement admettre que le DPN et le TPN sont deux substrats pour une même enzyme? Les premières indications contraires ont été fournies au cours d'expériences effectuées en vue de l'action des corticostéroïdes sur la synthèse du TPN, par un extrait de poudre acétonique de foie. Ces expériences ont montré que la cortisone inhibe l'hydrolyse du TPN, mais non celle du DPN. Cette indication encourageante permettait d'espérer la séparation de deux pyridine-nucléotidases spécifiques qui, de plus, se trouvaient en solution dans les préparations.

Démontrer l'existence de pyridine-nucléotidases spécifiques, vérifier s'il en est toujours ainsi, obtenir ces enzymes en solution et les purifier, tels sont les problèmes qui se sont posés quand j'ai entrepris mon travail.

ALIVISATOS et WOOLLEY (1956) solubilisent la DPN-ase de la rate de boeuf après traitement à l'alcool isoamylique; la technique de purification améliorée encore en 1960 (ALIVISATOS et coll.) ne donne pourtant qu'un rendement de l'ordre de 2,5 p. 100 de l'activité d'origine.

Enfin, en 1957 (a), HOFMANN. répond en partie à nos préoccupations. Il décrit une méthode de solubilisation et de purification de la DPN-ase des érythrocytes de Lapin; également après utilisation de l'alcool isoamylique. La même année, HOFMANN (1957 b) signale la plus grande thermolabilité de la DPN-ase des érythrocytes de lapin; l'application de cette remarque permet d'obtenir une suspension de ces érythrocytes n'hydrolysant que le TPN.

Mes propres résultats confirment ces travaux. Il est possible de solubiliser les pyridine-nucléotidases animales, quand elles ne sont pas directement en solution, cas des enzymes du sperme de taureau; de même, j'ai montré l'existence de différentes sortes de pyridine-nucléotidases, certaines, comme dans le foie, sont strictement spécifiques du TPN ou du DPN; d'autres, comme celle du sperme hydrolysent ces deux cofacteurs.

La question de savoir si les pyridine-nucléotidases sont toutes des transglycosidases sera seulement abordée. Aucune preuve n'est encore apportée au sujet de leur fonction physiologique. Pour KAPLAN et ses collaborateurs (1959), les PN-ases seraient plutôt des transglycosidases, mais aucun analogue du DPN n'a été isolé chez les êtres vivants. Il faut faire exception pour la désamido-DPN (analogue nicotinique) isolé par SERLUPI-CRESCENZI en 1957 du sang humain et du *Penicillium chrysogenum*, sa présence peut être rattachée à la synthèse des pyridine-nucléotides selon le schéma de HANDLER.

Le nom donné à l'enzyme qui hydrolyse la liaison nicotine-mide-ribose des pyridine-nucléotides a varié selon les auteurs. Depuis la cozymase-nucléotidase de MANN et QUASTEL (1941), nous avons eu la diphosphopyridine-nucléotidase (KAPLAN et coll., 1951), la diphosphopyridine-nucléoside (QUASTEL et ZATMAN, 1953) et la diphosphopyridine-nucléotide-nucléotidase (MALKIN et DENSTEDT, 1956).

Il est difficile de faire un choix dans ces diverses dénominations, aucune d'entre elles ne précise quelle est la liaison hydrolysée; j'utiliserai donc la première forme pour des raisons d'antériorité. La cozymase portant aujourd'hui le nom de diphosphopyridine-nucléotide, les enzymes seront la diphosphopyridine-nucléotidase ou la triphosphopyridine-nucléotidase selon leur spécificité; plus simplement je dirai pyridine-nucléotidase lorsqu'il n'y aura pas lieu de préciser la spécificité ou lorsqu'elle fera défaut.

Chapitre II

MATERIEL ET TECHNIQUES UTILISES

Les produits chimiques

Le DPN et le TPN proviennent de la Sigma Chemical Company (U.S.A.). Ils sont purs à 85 - 95 p. 100 de produit anhydre comme nous l'avons vérifié en utilisant les techniques de dosage décrites ci-dessous. Le DPN contient en moyenne 8 p. 100 de la forme α , quantité déterminée par la différence entre les résultats obtenus par la méthode enzymatique qui mesure le seul DPN et la méthode au cyanure qui mesure les deux formes. Le TPN est exempt de dérivé α . Pour les travaux préliminaires, le TPN a été préparé en utilisant la DPN-kinase de WANG et KAPLAN (1954).

La nicotinamide, l'isonicotinamide, l'acide isonicotinique, l'hydrazide de l'acide isonicotinique et son dérivé isopropyl (Marsilid), l'ergothionéine, le pyridoxal-5-phosphate, la thiamine et la thiamine-pyrophosphate proviennent des Etablissements Hoffman-Laroche. L'acide 5-fluoronicotinique nous a été aimablement offert par les Laboratoires de Recherches de Lilly (U.S.A.).

Le Tris utilisé pour les solutions tampons, le glucose-6-phosphate de sodium, l'ATP, l'ADP, le GDP, la poudre de cellulose modifiée (DEAEC), sont des produits Sigma.

Les résines Amberlite sont de la qualité pour analyse chromatographique (Rohm et Haas Company, U.S.A.).

Les autres substances chimiques sont fournies par Prolabo en qualité pour analyse.

L'alcool-déshydrogénase de levure a été préparé selon la

méthode de RACKER (1950) et la glucose-6-phosphate déshydrogénase (Zwischenferment) est celle de la Maison Boehringer (Allemagne).

Préparation du DPNH et du TPNH.

Dans un tube de Thunberg, on dissout, dans 4 ml de bicarbonate de sodium 0,1 M, 20 mg de DPN ou de TPN; on ajoute 0,75 ml de solution récente d^{hydro} sulfite de sodium à 1 p. 100. Après avoir fait le vide, on laisse incuber 1h. à 37°; le tube est refroidi avant l'ouverture, on introduit 0,25 ml de soude 0,1 N puis on fait passer pendant 5 minutes un courant d'air. La solution se conserve congelée; elle est utilisée dans les quelques jours qui suivent sa préparation.

Préparation du NMN.

La nicotinamide-mononucléotide a été préparée selon la technique de KAPLAN et STOLZENBACH (1955) par hydrolyse du DPN en présence de la pyrophosphatase du venin de *Crotalus adamanteus* (fourni par l'Institut Pasteur). L'enzyme préparée selon HURST et BUTLER (1951) contient également une 5'-nucléotidase, nous avons en fait obtenu une nicotinamide-mononucléotide accompagnée d'un peu de nicotinamide-riboside et d'adénosine.

Les méthodes de dosage

Dosage des protéines :

J'ai utilisé la méthode spectrophotométrique de WARBURG et CHRISTIAN (1941). Dans les solutions troubles, l'azote protéique est estimé après minéralisation sulfurique en présence de perhydrol et dosage colorimétrique de l'ammoniaque par la méthode au phénol-hypochlorite (LUBOCHINSKY et ZALTA, 1954); ces différentes déterminations sont reliées entre elles par l'équation suivante :

$$\text{mg N protéique (minéralisation)} \times 6,25 = \text{mg de protéine (spectrophotométrie)}$$

Dosage du DPN et du TPN :

Deux méthodes ont été utilisées, l'une enzymatique et très spécifique permet la différenciation des deux cofacteurs, mais ne précise pas la nature de la modification subie par la molécule, l'autre chimique et dont la spécificité est restreinte à la liaison nicotinamide-ribose.

Méthodes enzymatiques

A - Le DPN est dosé d'après la méthode de RACKER (1950). Après incubation, le tube à expérience est porté 2 min. à 90° puis centrifugé pour éliminer les protéines coagulées lorsqu'il y a lieu. Une partie aliquote (0.05 à 0.4 μ mole) est placée dans une cuve de silice de 1 cm de large en présence de 0.2 ml de tampon Tris pH 10, 0.5 M et 0.2 ml d'éthanol 1.5 M; le volume est complété à 3 ml avec de l'eau distillée. Les lectures sont effectuées avant et après addition d'une solution d'alcool déshydrogénase de levure (20 μ l d'une solution à 20 000 unités/ml). Tout le DPN à doser est réduit dans nos conditions en moins de 2 min. La densité optique est mesurée à 240 m μ au moyen du spectrophotomètre de Jobin et Yvon; la quantité de DPN présent est calculée à partir de l'augmentation de la densité optique, en utilisant $E_{mM} = 6.22$ valeur déterminée par HORECKER et KORNBERG (1948).

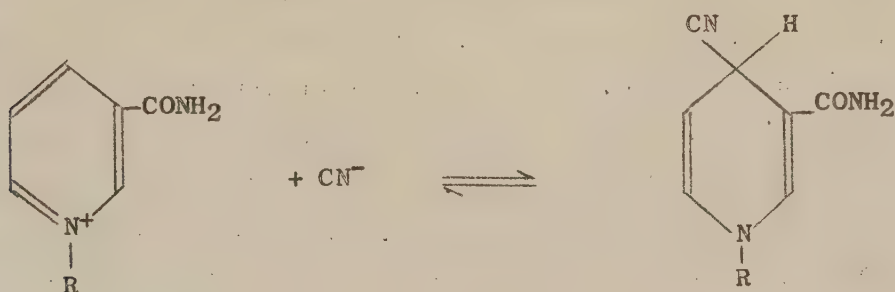
B - Le TPN est dosé après réduction par la glucose-6-phosphate déshydrogénase (WARBURG et coll., 1935). Une partie aliquote de l'incubation, préparée comme pour le dosage du DPN, est placée dans la cuve de silice, en présence de 0.3 ml de tampon Tris, 0.5 M, pH 7.5; 0.2 ml de MgCl₂, 0.15 M et 0.2 ml de glucose-6-phosphate de sodium, 0.1 M; le volume est complété à 3 ml avec de l'eau distillée.

Les lectures sont effectuées avant et après addition d'une solution de glucose-6-phosphate déshydrogénase (20 μ l d'une solution à 20 unités/ml). Tout le TPN à doser est réduit dans ces conditions en moins de 2 min. La densité optique est mesurée à 340 m μ et la quantité de TPN présent calculée comme pour le DPN (HORECKER et KORNBERG 1948).

Méthode chimique

Le spectre d'absorption du DPN en présence de cyanure est semblable à celui que l'on obtient par la réduction enzymatique (MEYERHOF et coll., 1938). A partir de cette remarque, COLOWICK et coll. (1951) ont mis au point une méthode de dosage du DPN et du TPN, qui est en fait une méthode de dosage spécifique de la liaison nicotinamide-ribose puisque le nicotinamide-riboside, le nicotinamide-mononucléotide donnent des spectres très voisins en présence de cyanure.

Pour être plus précis, la présence de l'azote quaternaire est nécessaire et suffisante pour obtenir le dérivé d'addition du cyanure sur le carbone γ par rapport à l'azote.



La nicotinamide libre ne réagit pas, on peut donc suivre l'hydrolyse de la liaison nicotinamide-ribose, sans se préoccuper des transformations subies en d'autres points de la molécule de pyridine-nucléotide.

La méthode permet de suivre spécifiquement l'action des pyridine-nucléotidases, même dans un extrait brut, par exemple en présence de pyridine-nucléotide pyrophosphatase.

Pour les déterminations, la prise d'essai (0.05 à 0.4 μ moles) est amenée à 3 ml, en présence d'une quantité suffisante de cyanure de potassium pour que la concentration finale soit molaire et la lecture effectuée à 325 m μ contre une solution molaire de cyanure.

La diminution de densité optique par rapport à la lecture faite pour le témoin non incubé, correspond à la quantité de pyridine-nucléotide hydrolysé. On utilise les coefficients suivants :

pour le DPN : $E_{mM} = 6.22$

pour le TPN : $E_{mM} = 6.0$

Remarque sur la méthode d'arrêt des incubations.

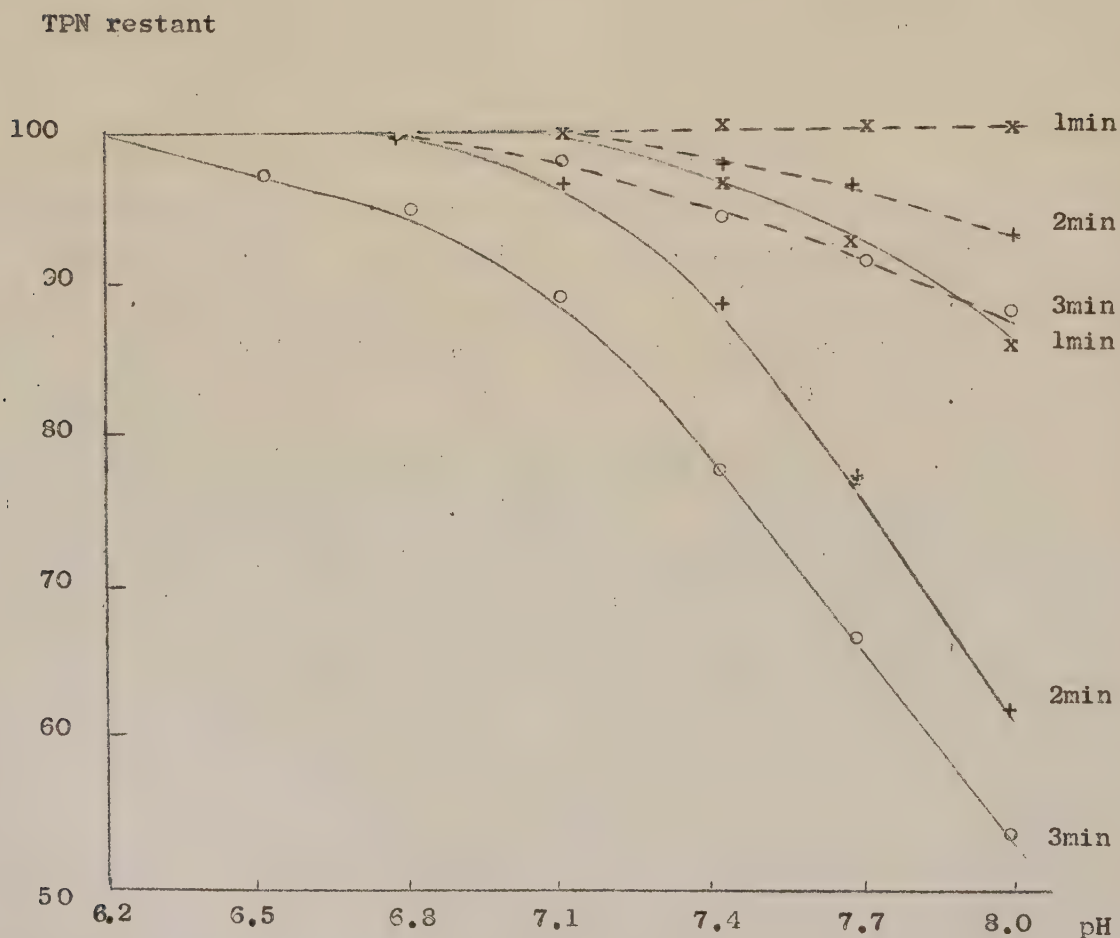
A la fin d'une incubation, l'expérience est arrêtée soit par addition de cyanure, soit par inactivation thermique. Dans ce dernier cas, la température atteinte et la durée du traitement ne sont pas sans importance pour la précision des dosages ultérieurs du DPN et du TPN. En effet, au cours de l'inactivation thermique de l'enzyme, il y a hydrolyse spontanée de la liaison nicotinamide-ribose. Cette hydrolyse est fonction entre autres facteurs, de la température, du pH et de la nature du tampon. Pour ce qui est du tampon, l'influence défavorable provient, comme nous l'avons vérifié, essentiellement de la présence des cations minéraux; l'effet "protecteur" du Tris, signalé par les auteurs relève en partie de sa substitution aux autres ions dans les tampons utilisés.

Les expériences ont été effectuées en présence de 0.16 μ mole de TPN dans un volume final de 0.3 ml. Les tampons Tris-maléique et Tris-phosphorique, 0.08 M en Tris, et les tampons phosphate de potassium, 0.08 M en PO_4^{---} sont utilisés au pH qui sera indiqué. Le chauffage a lieu dans un bain-marie à 100°, il est interrompu par l'addition de 2,6 ml de CNK froid. Les résultats sont reportés sur la fig. 1

En présence de Tris à 90°, nous n'avons constaté aucune hydrolyse après 2 min d'incubation. Toutes les expériences ultérieures ont été effectuées en présence de ce tampon qui est par ailleurs sans influence sur l'activité enzymatique; la dénaturation thermique de l'enzyme se fera à 90°, température suffisante pour l'inactivation.

Figure I

Mesure de l'hydrolyse spontanée
du TPN à 100° en fonction du pH



En trait plein : quantité de TPN présent après incubation
à 100° en présence tampon phosphate K

En pointillé : incubation en présence de tampon Tris.

Valeurs exprimées en p. 100 du TPN présent à l'origine.

Dosage de la nicotinamide

Les méthodes de dosage concernant cette substance sont relativement nombreuses. La difficulté présentée par leur application dans nos conditions expérimentales provient du fait que la nicotinamide libre qu'il s'agit de doser représente à peu près 0.1 μ mole et ceci en présence de quantités voisines et généralement supérieures de pyridine-nucléotides.

J'utilise la méthode classique de dégradation de la nicotinamide en présence de bromure de cyanogène (réaction de KONIG), puis copulation du produit formé avec une amine aromatique. Compte tenu de la labilité de la nicotinamide dans le DPN et le TPN, j'opère en milieu légèrement acide et à la température du laboratoire selon la méthode utilisée par Mc ILWAIN et RODNIGHT (1949) adaptée à mes conditions.

Solution de brome

La solution saturée d'eau de brome ne permet d'obtenir que des solutions à environ 4 p. 100 de bromure de cyanogène. Je préfère la préparation plus stable, plus concentrée, de titre fixe préconisée par HOLMAN (1954) :

15 g de bromure de potassium sont dissous dans une petite quantité d'eau en présence de 4 ml de brome, puis le tout est amené à 100 ml; cette solution s'est conservée plus de trois mois au réfrigérateur, sans altération visible.

Solution de bromure de cyanogène tamponnée.

A la préparation précédente on ajoute du cyanure de potassium, en solution saturée, jusqu'à complète décoloration puis ensuite un volume égal de solution de phosphate monopotassique 0.33 M. Le pH mesuré à l'électrode de verre, est amené à 5.5 par addition d'acide acétique. Ce mélange, conservé à froid, dans un flacon fermé par un rodage siliconé, est stable au moins une semaine.

.....

Solution de métaphénylène diamine

C'est une solution à 2 p. 100 du dichlorhydrate de métaphénylène diamine. (produit Eastman Kodak).

Mc ILWAIN et RODNIGHT préparaient une solution dans l'acide chlorhydrique 0.5 N. Une telle acidité s'est révélée nocive du point de vue du développement de la coloration et de sa stabilité. Cette différence provient vraisemblablement du fait que le pH est à 5.5 pour l'action du bromure de cyanogène, là où les auteurs précédents sont à un pH 6.5 à 7, trop élevé pour la copulation.

Technique de dosage utilisé :

- La prise d'essai contenant de 2 à 20 µg de nicotinamide est amenée à 0.4 ml;
- On ajoute 2 ml de bromure de cyanogène;
- On attend 30 min à la température du laboratoire, puis on ajoute 0.6 ml de métaphénylène diamine;
- 5 min après avoir agité, il est possible d'effectuer les mesures. La coloration lue à 425 mµ est stable environ une heure.
- Une courbe étalon est établie dans les mêmes conditions.

Dans les expériences où il a été fait usage de préparation enzymatique brute, nous avons effectué une défécation préalable par le sulfate de zinc et la baryte, selon la technique de SOMOGYI (1945).

Dosage de l'ADPR et de P-ADPR

Il est difficile de doser le pouvoir réducteur apparu à la suite de la scission de la liaison nicotinamide-ribose. Toutes les méthodes utilisées en milieu alcalin provoquent l'hydrolyse spontanée de cette liaison, et l'on dose donc le ribose lié du DPN et du TPN comme la fonction libre du ribose.

La seule méthode disponible, délicate dans son application, est celle qui utilise le réactif de BARFOED (1881) tel qu'il a été modifié par TAUBER-KLEINER (1932). Il s'agit d'une solution acide de

lactate de cuivre, qui, chauffée 3 min à 100° avec les pyridine-nucléotides ne donne qu'une faible réaction, tandis que le produit d'hydrolyse enzymatique réagit comme le ribose libre. Afin d'obtenir une meilleure réduction du cuivre, COLOWICK et coll. (1951) ajoutent 2 g d'acétate de sodium pour 100 ml de réactif. Cette addition a déjà été préconisée par REYNOSO (1885) et ROAF (1920). Lors des premiers essais, l'utilisation du tampon Tris pour les expériences nous avait beaucoup gêné au moment du dosage; cela était dû, en fait, à la présence des ions Cl^- (TAVERNIER, 1924) ajoutés au tampon pour l'amener au pH désiré.

Technique utilisée :

- La prise d'essai, contenant 0.1 à 0.4 μmole de DPN ou de TPN hydrolysé est amenée à 0.5 ml, dans un tube à essai fermé par un rodage.
- On ajoute 0.5 ml du réactif de BARFOED modifié.
- On chauffe 3 min exactement, au bain-marie bouillant, puis on refroidit.
- On ajoute ensuite 0.5 ml de réactif arsénomolybdique de NELSON (1944) puis 0.5 ml de citrate trisodique en solution molaire.
- On amène à 3 ml; les lectures sont ensuite effectuées à 520 m μ au spectrophotomètre.

Dosage du phosphore :

Le dosage de l'ion orthophosphate est effectué selon la technique de ROCKSTEIN et HERRON (1951), dérivée de celle mise au point par SUMNER (1944). Elle utilise les propriétés réductrices du sulfate ferreux; la réduction du complexe phosphomolybdique s'opère à froid; elle donne une intense coloration, stable au moins 24 h pour des concentrations de l'ordre de 0.1 $\mu\text{mole/ml}$. Les lectures sont effectuées au spectrophotomètre, à 720 m μ .

Dosage de l'ATP

J'ai utilisé la formation de glucose-6-phosphate qui a lieu

en présence d'ATP, de glucose et d'Hexokinase.



Le glucose-6-phosphate formé est ensuite dosé par la mesure du TPN réduit en présence de glucose-6-phosphate déshydrogénase.



Pour 1 mole de TPNH formé, il y avait 1 mole d'ATP.

On opère donc comme pour le dosage du TPN, en remplaçant le glucose-6-phosphate par une solution de glucose 0.5 M. On ajoute également de l'hexokinase de levure cristallisée (20 µl d'une solution à 100 unités/ml) et 0.5 µmole de TPN. Après avoir déterminé la densité optique à 340 mµ, on ajoute 20 µl de glucose-6-phosphate déshydrogénase. Dans ces conditions la réaction est totale et terminée en moins de 5 min.

Dosage de l'INH-analogue du TPN

L'analogue du TPN est dosé selon ZATMAN et coll. (1954 b) en présence de soude 0.1 N. L'intensité de la couleur jaune, qui se développe dans ces conditions, est mesurée à 385 mµ; bien qu'il s'agisse d'un corps peu différent de l'analogue du DPN, j'utilise le coefficient millimolaire d'absorption tel qu'il a été déterminé pour celui-ci par les auteurs précités :

$$E_{\text{mM}} = 4.9$$

Préparation de la poudre acétonique de foie.

Les animaux, Rats, Pigeons, Poules, provenant de différents élevages, sont décapités; le thorax est immédiatement incisé, le foie prélevé puis lavé par simple passage dans de l'eau distillée glacée. Le foie de Mouton, recueilli à l'abattoir au moment du dépeçage, est aussitôt refroidi dans de la glace pilée; au moment de l'utilisation, deux ou trois heures plus tard, il est également lavé dans de l'eau distillée.

Les foies sont ensuite découpés en fragments de 2 à

5 g en moyenne et plongés dans de l'acétone à -15° . Nous utilisons 500 ml d'acétone pour 30 g de tissu. La pulvérisation est réalisée au moyen d'un "Waring blender". Au départ, la température de l'acétone se trouve comprise entre -8° et -10° ; après broyage d'une durée totale de 90 secondes, avec brève interruption toutes les 30 secondes, la température remonte vers -4° . A ce moment nous poursuivons le broyage jusqu'à ce que la température soit comprise entre -1° et 0° . Cette précaution est nécessaire; les tissus congelés lors de leur introduction dans l'acétone froide peuvent ne pas être déshydratés au cours d'un broyage rapide à une température trop basse, les cristaux de glace n'ayant pas le temps de fondre.

Lorsque la température atteint 0° , le mélange est filtré sur un Buchner. La filtration est accélérée par aspiration à l'aide d'une trompe à eau. Le résidu est repris dans 150 ml d'acétone à -5° , refiltré puis à nouveau lavé de la même façon.

Après cette dernière filtration, l'aspiration est maintenue quelques minutes, ce qui a pour effet d'accélérer la dessiccation; l'évaporation rapide de l'acétone empêche l'élévation de la température. Lorsque la pâte se trouvant sur le Buchner commence à se fendiller, elle est étalée en une mince couche sur un couvercle de boîte de Pétri, puis séchée sous vide en présence d'acide sulfurique concentré. Le dessiccateur est placé au réfrigérateur maintenu à 4° .

Après 16 à 24h., la préparation est pulvérisée au mortier; les quelques fibres hépatiques présentes sont éliminées.

La poudre obtenue est conservée au réfrigérateur en l'absence d'humidité.

De telles préparations essayées après deux ans de conservation n'avaient rien perdu de leur activité.

A partir de 30 g de foie, on obtient en moyenne 7 g de poudre conservant au moins 70 p. 100 de l'activité enzymatique d'origine.

Préparation de la poudre acétonique d'érythrocytes

Du sang de Lapin, obtenu par ponction cardiaque ou par incision de la veine marginale de l'oreille, est défibriné par agitation

en présence de billes de verre, puis passé sur étamine. Le sang de boeuf et de porc est collecté aux abattoirs en présence d'héparine; celui d'origine humaine, citraté et glucosé, provient du centre de transfusion sanguine. Ces sangs sont lavés avec 5 volumes de solution de chlorure de sodium à 9 p. 1000. Les érythrocytes sont séparés par centrifugation de 10 min à 5000 t/min. Le lavage est répété deux fois.

Le dernier culot de centrifugation est hémolysé avec quatre fois son volume d'eau distillée. Afin de faciliter la précipitation du stroma, on ajoute, après 15 min, un volume égal à celui des érythrocytes d'une solution de 0.25 M de phosphate monopotassique. La préparation est centrifugée 20 min à 20 000 g. Le stroma est lavé avec le même volume d'eau qui a servi à hémolyser les globules rouges; on fait passer dans la suspension un courant de gaz carbonique pendant 15 min afin de faciliter la formation de carboxyhémoglobine plus soluble. Ce lavage est répété deux fois, le surnageant d'une centrifugation de 10 min à 20 000 g étant éliminé.

Le dernier culot de centrifugation est mis en suspension dans 10 fois son volume d'acétone à - 10°. Toutes les opérations ayant été jusque là effectuées à la chambre froide à + 4°. Après suspension dans l'acétone, le reste des opérations, à partir de la filtration sur Buchner, s'effectue à la température du laboratoire. Pour la poudre acétonique de stroma d'érythrocytes, nous avons même séché presque complètement la poudre à la température du laboratoire, en présence d'un léger courant d'air, sans que cela altère l'activité enzymatique. Le séchage final est effectué sous vide, en présence d'acide sulfurique concentré.

La pulvérisation du produit sec donne une poudre d'un beige assez clair. A partir de 100 ml de globules rouges, on obtient en moyenne 5 g de poudre contenant pratiquement toute l'activité enzymatique d'origine. Cette activité se retrouve intacte après six mois de conservation au froid et au sec.

Poudre acétonique de liquide spermatique (ou plasma séminal).

Le sperme de taureau, collecté par le Centre d'Insémination Artificielle de l'Ecole Vétérinaire de Maisons-Alfort, est centrifugé 20 min à 20 000 g pour éliminer les spermatozoïdes; le surnageant est aussitôt congelé à - 20°. Celui qui a été utilisé pour notre préparation est un mélange de différentes fractions congelées depuis 15 jours à 2 mois, délai nécessaire pour obtenir un volume suffisant.

Au moment de l'utilisation, le stock de surnageant est décongelé, dilué avec un volume égal d'eau distillée à 0°. Le tout est versé dans 10 fois son volume d'acétone à - 15°, avec une agitation constante maintenue jusqu'à ce que la température remonte à 0°.

Après filtration sur Buchner, la suite des opérations est semblable à celle concernant la préparation de poudre acétonique de stroma d'érythrocytes.

On obtient à partir de 50 ml de surnageant de liquide spermatique 4.7 g d'une poudre blanche contenant toute l'activité enzymatique du liquide d'origine. La conservation en réfrigérateur et à sec est excellente. J'ai pu ainsi conserver 13 mois une poudre qui n'a rien perdu de son activité.

Chapitre III

ETUDE DE

LA TRIPHOSPHOPYRIDINE-NUCLEOTIDASE

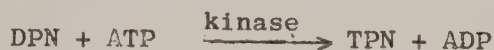
DU FOIE DE PIGEON ET DE RAT

Lorsque j'ai commencé ce travail, il était généralement admis que la diphosphopyridine-nucléotidase hydrolysait la liaison nicotinamide-ribose du DPN et du TPN. Mc ILWAIN et RODNIGHT (1949 b) avaient même montré qu'au cours de l'hydrolyse d'un mélange de DPN et de TPN sous l'action de la DPN-ase du cerveau, il y a compétition entre les deux substrats. Pourtant, à l'issue des expériences au cours desquelles j'ai, en collaboration avec STOLKOWSKI, examiné l'action des corticoïdes (cortisone, hydrocortisone et désoxycorticostérone) sur la synthèse du TPN à partir du DPN, il a fallu supposer l'existence de deux pyridine-nucléotidases spécifiques différentes pour expliquer les résultats. Il devenait alors intéressant de vérifier l'hypothèse qui apportait un élément nouveau à la connaissance du métabolisme des pyridine-nucléotides.

Synthèse du TPN par un extrait de foie, en présence de cortisone.

Notre intention était d'étudier l'action des corticoïdes sur la synthèse du TPN.

Cette synthèse du DPN à partir du DPN et de l'ATP, se réalise par le transfert du phosphate terminal de l'ATP sur le DPN en présence d'une DPN-kinase (EULER et VESTIN 1938). On peut représenter ce transfert par l'équation suivante :



La méthode la plus commode pour mesurer l'activité de la

kinase consiste à doser le TPN formé.

Dès les premiers résultats, avec la kinase contenue dans un extrait brut de poudre acétonique de foie de Pigeon, (MEHLER et coll., 1938), nous avons constaté qu'il se formait une plus grande quantité de TPN lorsque l'incubation avait lieu en présence de cortisone.

La préparation enzymatique, utilisée pour l'expérience est obtenue en homogénéisant 500 mg de poudre acétonique de foie de Pigeon dans 6 ml de solution de bicarbonate de potassium 0.02 M; l'homogénat est ensuite centrifugé 20 min à 20 000 g pour éliminer l'insoluble. Ces opérations sont faites à froid, entre 0 et 2°. Le surnageant contient en moyenne 21 mg de protéines par ml, il est dialysé trois heures contre du bicarbonate 0.02 M pour éviter la réduction des pyridine-nucléotides par les substrats endogènes; ce surnageant, dialysé, est l'extrait enzymatique brut.

Les incubations sont effectuées en présence de : DPN, 3.5 μ moles; ATP, 4 μ moles; nicotinamides, 5 μ moles, $MgCl_2$, 5 μ moles, tampon Tris, pH 7.5, 100 μ moles; extrait enzymatique brut, 0.2 ml; cortisone, lorsqu'elle est ajoutée, 1.7 μ mole. Volume final, 1.2 ml. Durée de l'incubation, 90 min à 37°. Les tubes sont ensuite portés dans un bain-marie à 90° pendant 2 min pour inactiver l'enzyme; après centrifugation pour éliminer les produits coagulés, les dosages enzymatiques du TPN et du DPN sont effectués sur une partie aliquote.

Tableau 1

	TPN synthétisé m μ moles	Δ DPN m μ moles
sans cortisone	82	295
avec cortisone	123	235

La DPN-kinase semblait donc stimulée en présence de cortisone. J'ai voulu préciser ce fait par une préparation enzymatique purifiée qui aurait d'autre part permis d'établir un meilleur bilan.

Dans les incubations, l'extrait enzymatique brut a été remplacé par la DPN-kinase de foie de Pigeon partiellement purifiée : l'enzyme est précipitée par le sulfate de protamine, puis éluée du culot de centrifugation par un tampon acétate 0.2 M, pH 5.0 (WANG et KAPLAN, 1954).

L'expérience a été réalisée dans les mêmes conditions que la précédente, avec 0.2 ml d'enzyme partiellement purifiée et diluée 5 fois. Les résultats sont concluants, la cortisone ne stimule pas la DPN-kinase partiellement purifiée.

TPN synthétisé	sans cortisone		246 mμmoles
TPN synthétisé	avec cortisone		239 mμmoles

Il convenait dès lors de reprendre l'expérience en présence d'un extrait brut et de tenir compte du fait que la DPN-kinase contenue dans l'extrait brut de poudre acétonique de foie de pigeon est évidemment accompagnée de nombreuses autres enzymes. Nous pouvons en effet constater dans le tableau I qu'il y a plus de DPN dégradé ou transformé que de TPN synthétisé.

J'ai donc établi un bilan complet de l'expérience, en dosant le DPN, le TPN et l'ATP présents au début et à la fin de l'incubation; les pyridine-nucléotides ont été dosés à la fois par la méthode enzymatique et par celle au cyanure.

Les résultats reportés dans le tableau II sont le reflet final de différentes réactions possibles.

En particulier, le nombre de μmoles de DPN transformé est supérieur au nombre de μmoles d'ATP dégradé. A la DPN-kinase s'ajoute donc l'action des autres enzymes, qui hydrolysent une partie du DPN. Il s'agit essentiellement de la diphosphopyridine-nucléotidase dont l'activité n'est pas totalement inhibée, malgré la présence de nicotinamide dans le milieu d'incubation; cette activité peut d'ailleurs être mesurée par la méthode au cyanure de potassium (dernière colonne du tableau II).

Tableau II

Action de la cortisone sur un extrait brut
de poudre acétonique de foie de Pigeon

	Δ DPN m μ moles	Δ ATP m μ moles	TPN présent m μ moles	Δ TPN + DPN par CNK
avec sans cortisone	470	250	80	380
sans avec cortisone	472	262	115	340

Conditions expérimentales :

Ce sont celles qu'utilisent WANG et KAPLAN (1954), au cours de la purification de la DPN-kinase. Les seules modifications apportées portent sur le volume final de chaque incubation et la concentration, plus faible des réactifs.

Chaque tube contient : DPN, 3.5 μ moles; ATP, 4 μ moles; nicotinamide, 5 μ moles; Mg Cl₂, 5 μ moles; tampon Tris, pH 7.5, 100 μ moles; extrait enzymatique brut, 0.2 ml. Volume final, 1.2 ml. Durée de l'incubation, 90 min à 37°. Cortisone quand il y a lieu : 1.7 μ mole.

L'extrait enzymatique brut est obtenu en homogénéisant 500 mg de poudre acétonique de foie de pigeon dans 6 ml de solution de bicarbonate de potassium 0.02 M; l'homogénat est ensuite centrifugé 20 min à 20 000 g pour éliminer l'insoluble. Le surnageant contient en moyenne 21 mg de protéines par ml, il est dialysé 3h contre le bicarbonate 0.02 M pour éviter la réduction des pyridine-nucléotides par les substrats endogènes.

D'après ces résultats, la cortisone est sans effet sur la kinase puisqu'il y a autant d'ATP dégradé en sa présence qu'en son absence; elle semble également sans effet sur l'hydrolyse du DPN puisque sans effet sur la quantité totale de DPN disparu, hydrolysé par la DPN-ase ou transformé par la kinase.

Le résultat final peut donc s'expliquer de la façon suivante : la quantité de TPN synthétisé n'est pas influencée par la cortisone; ce qui est inhibé, c'est l'hydrolyse du TPN; nous aurons en apparence, plus de TPN formé en présence de cortisone et moins de nicotinamide libérée.

I - HYDROLYSE DU TPN PAR UN EXTRAIT DE FOIE, EN PRESENCE DE CORTISONE

L'hypothèse précédente a été vérifiée en faisant agir l'extrait brut de poudre acétonique de foie de Pigeon sur du DPN et sur du TPN en l'absence d'ATP pour éliminer l'action pyridine-nucléotidique; le bilan de cette expérience est présenté dans le Tableau III.

La concordance des résultats obtenus par les dosages à l'aide des méthodes enzymatiques et au cyanure permet la conclusion suivante : l'hydrolyse de la liaison nicotinamide-ribose du DPN n'est pas inhibée par la cortisone; l'hydrolyse de la même liaison, dans le TPN, est partiellement inhibée. Cette inhibition de l'hydrolyse par la cortisone varie d'ailleurs en fonction du temps; nulle au début, elle devient de plus en plus importante quand l'incubation se prolonge (Fig.2). Des résultats semblables ont été obtenus en présence d'hydrocortisone ou de désoxycorticostérone.

On admettait que c'est la même enzyme, la diphosphopyridine-nucléotidase qui hydrolyse la liaison nicotinamide-ribose du DPN et du TPN. Comment en ce cas expliquer l'inhibition de l'activité enzymatique en présence d'un seul des substrats? Il fallait donc bien admettre l'existence, dans le foie de pigeon, de deux enzymes différentes, une DPN-ase et une TPN-ase.

Au cours de leur travail sur la diphosphopyridine-nucléotidase, Mc ILMAIN et RODNIGHT (1949 b) ont montré que la même enzyme

Tableau III

Action de la cortisone sur l'hydrolyse du TPN par un extrait brut de poudre acétonique de foie de pigeon.

Substrat		Δ sans cortisone m μ moles	Δ avec cortisone m μ moles	Inhibition pour 100
T P N	dosage enzymatique	225	171	24
	dosage au CNK	226	170	25
	nicotinamide libre (1)	150	100	50
D P N	dosage enzymatique	317	325	0
	dosage au CNK	312	314	0
	nicotinamide libre	230	220	

Conditions expérimentales :

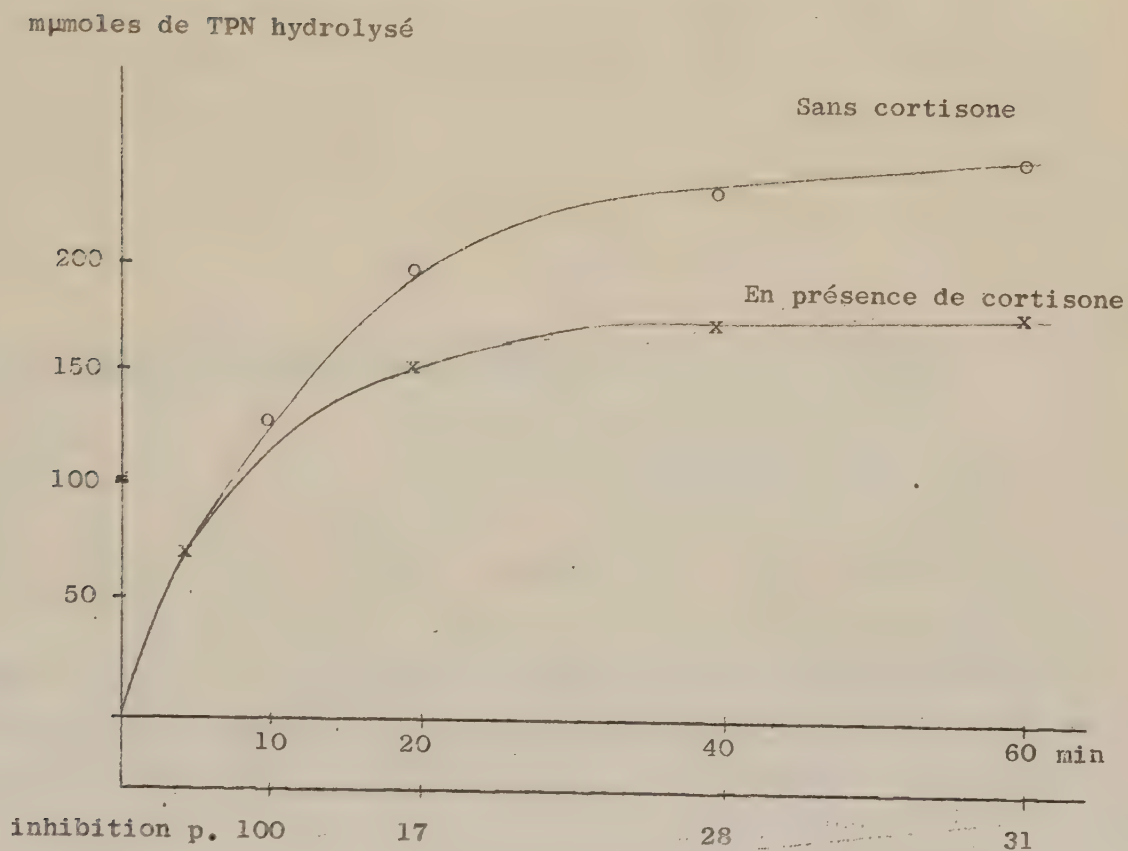
DPN ou TPN 0.5 μ mole ; tampon, extrait enzymatique et cortisone comme dans le tableau précédent.

Incubation de 60 min à 37°. Dosages enzymatiques pour le DPN et le TPN; dosage par la méthode au bromure de cyanogène pour la nicotinamide.

- (1) Remarque : Les quantités de nicotinamide dosées sont inférieures aux quantités attendues : l'extrait brut métabolise une partie de la nicotinamide libérée. Les valeurs obtenues restent néanmoins comparables entre elles.

Figure 2

Action de la cortisone sur l'hydrolyse du TPN
par un extrait brut de foie
en fonction du temps d'incubation



conditions du tableau III, seule varie la durée
des expériences.

hydrolysait le TPN et le DPN puisqu'il y avait compétition entre les deux substrats lorsqu'ils étaient mélangés. Une expérience semblable a été effectuée avec l'enzyme du foie. L'extrait enzymatique brut est incubé en présence d'un mélange de DPN et de TPN; à titre de témoins, des incubations parallèles contiennent du DPN et du TPN, à deux concentrations différentes pour tenir compte de l'influence de la concentration en substrat, sur la vitesse d'hydrolyse.

Les résultats groupés dans le tableau IV, montrent que chaque nucléotide est hydrolysé comme s'il se trouvait seul : alors que la vitesse d'hydrolyse est plus élevée en présence d'une quantité double de substrat, la présence simultanée du DPN et du TPN est sans répercussion sur la vitesse d'hydrolyse de chacun d'entre eux.

L'existence de deux enzymes séparées, une TPN-ase et une DPN-ase différentes est ainsi montrée; la certitude ne pouvait provenir que de l'isolement de chacune d'entre elles.

II - EXPERIENCES MONTRANT L'EXISTENCE DE DEUX ENZYMES SPECIFIQUES

L'existence vraisemblable de la DPN-ase et de la TPN-ase dans l'extrait enzymatique brut a été démontrée par des voies indirectes. Elle peut être définitivement prouvée par la mise en évidence d'une seule des activités, après élimination de l'autre. Plusieurs méthodes sont utilisables à cette fin. Elles sont fondées sur le comportement différent des deux enzymes au cours d'une dialyse prolongée, de la purification par adsorption du gel de phosphate de calcium ou bien sur la sensibilité à l'inactivation par la chaleur.

a) Comportement à la dialyse prolongée

Les expériences précédemment décrites ont été effectuées à l'aide de préparations dialysées trois heures pour éviter la réduction des pyridine-nucléotides par les différents systèmes enzymatiques présents dans l'extrait brut. Lorsque les durées de dialyse ont été augmentées, nous n'avons pas constaté de baisse d'activité notable pour la DPN-ase, tandis que l'activité de la TPN-ase, stable les premières heures, allait diminuant. Après 24 heures de dialyse,

Tableau IV

Hydrolyse simultanée du TPN et du DPN par l'extrait
enzymatique du foie de Pigeon

substrat mmoles	DPN hydrolysé mmoles	TPN hydrolysé mmoles
DPN 350	185	
DPN 700	270	
TPN 350		136
TPN 700		190
DPN 350	190	
TPN 350		140

Conditions expérimentales

DPN ou TNP, quantités indiquées; tampon et extrait enzymatique de foie de Pigeon comme dans les tableaux précédents.

Incubation de 40 min à 37°. Dosages enzymatiques

la préparation ne contient plus que la moitié de la TPN-ase; cette activité n'est pas entièrement éliminée par une dialyse plus prolongée, mais cela devient possible si nous soumettons à la dialyse la fraction des protéines qui précipitent sur le sulfate d'ammonium entre 0 et 40 p. 100 de saturation (Fig. 3).

b) Adsorption sélective

Le même résultat est obtenu par une autre méthode qui consiste à utiliser l'adsorption sélective sur gel de calcium. Au cours de la purification de la DPN-ase des érythrocytes de lapin, HOFMANN constate que la DPN-ase est moins adsorbée que la TPN-ase, cette dernière ne pouvant plus s'éluer. J'ai utilisé cette remarque et traité l'extrait enzymatique brut par du gel de calcium. Effectivement, en utilisant des quantités convenables de gel, il est possible d'éliminer les trois quarts de l'activité de la TPN-ase, en conservant la DPN-ase en solution. Si l'extrait enzymatique dialysé 16h. est traité par le gel de calcium, la séparation des activités est totale : le surnageant de centrifugation n'hydrolyse plus le TPN, mais contient la DPN-ase. Ce résultat sera discuté et les techniques seront précisées à propos de la mise en évidence du cofacteur de la TPN-ase.

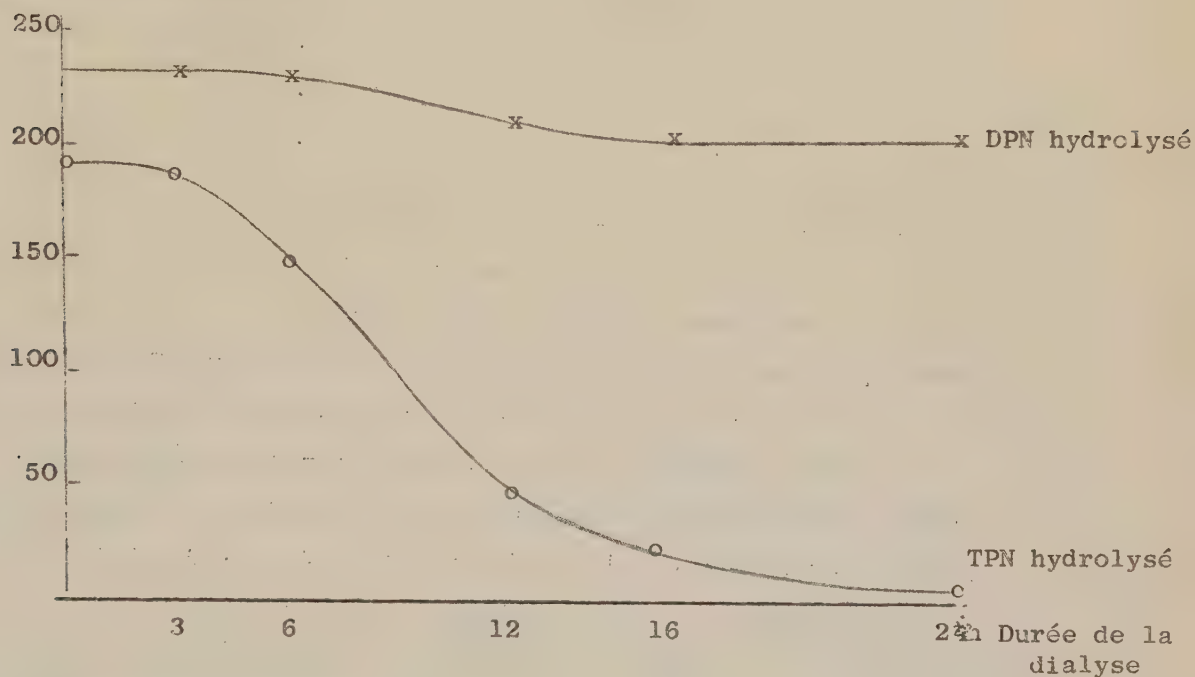
c) Sensibilité à l'inactivation par la chaleur.

Enfin, l'inactivation de la DPN-ase par la chaleur permet d'obtenir un résultat inverse, la TPN-ase active reste en solution tandis que toute la DPN-ase est inactivée. Cette méthode est efficace, aussi bien pour la TPN-ase du foie de Pigeon, que pour celle du foie de Rat, de la Poule ou du Mouton; seules varient la durée nécessaire du choc thermique et la température atteinte. La séparation des deux activités enzymatiques est totale. Après 10 min d'incubation à 45°, la DPN-ase est dénaturée; pour la TPN-ase, les différentes constantes de dénaturation à 55° sont rassemblées dans la tableau V.

Figure 3

Inactivation de la TPN-ase par dialyse prolongée

mmoles hydrolysées



Conditions expérimentales

500 mg de poudre acétonique de foie de pigeon sont homogénéisés dans 10 ml de solution de Tris à 0,05 M à pH 7,4. Le surnageant de centrifugation de 20 à 20 000 g constitue l'extrait brut

L'extrait brut est amené à 40 p. 100 de saturation par addition de 280 g/l de sulfate d'ammonium. Les protéines qui précipitent sont recueillies par centrifugation et dissoutes dans 5 ml d'eau. Cette préparation est dialysée avec agitation contre 1 l de Tris pH 7,4, 0,01 M renouvelé après 6h. et 16h. Des prélèvements sont effectués aux temps indiqués dans le tableau.

Chaque essai contient : DPN et TPN 0,3 μ mole de chaque Tris, pH 7,4, 100 μ moles, enzyme contenue dans 0,2 ml. Volume final 1,2 ml. Incubation de 40 min à 37°.

Dosages enzymatiques.

Tableau V

Constante d'inactivation de la TPN-ase du foie
de divers animaux, à 55°

Pigeon	k	=	0.008
Poule	k	=	0.069
Mouton	k	=	0.183
Rat	k	=	0.293

Technique utilisée pour la détermination de k

5 ml de l'extrait brut enzymatique étudié sont introduits dans un tube à essai de 16 mm de diamètre dans lequel plonge un thermomètre. Le tube est d'abord placé dans un bain-marie à 65°, jusqu'à ce que la température de l'extrait atteigne 55° (environ 30 secondes) puis il est transporté dans un second bain-marie réglé à 55°. L'extrait enzymatique est maintenu à cette température pendant 10 min pour les extraits de foie de Pigeon et de Poule, pendant 5 min pour celui de Mouton et 3 min seulement pour l'extrait de foie de Rat. A la fin de l'incubation, les extraits sont immédiatement refroidis dans de la glace pilée. Les protéines dénaturées sont éliminées par centrifugation. Les mesures d'activité enzymatique, avant et après le traitement thermique, sont effectuées dans les mêmes conditions expérimentales.

La constante d'inactivation k a été calculée à l'aide de l'équation de WILHELMY :

$$k = \frac{2.3}{t} \log \frac{A_0}{A_t}$$

A₀ et A_t représentent l'activité de l'extrait avant et après t minutes d'incubation à 55°

J'ai donc réussi, par différents procédés, à séparer la DPN-ase de la TPN-ase; l'individualité de ces deux enzymes est certaine. En réalité, seule la TPN-ase est obtenue exempte de DPN-ase; les préparations de DPN-ase n'hydrolysent pas le TPN, mais contiennent la protéine enzymatique qui active cette hydrolyse. Ce qui manque à la manifestation de son activité, c'est la présence d'un facteur éliminé au cours de la dialyse. C'est également ce facteur et non la TPN-ase, qui est adsorbé sur le gel de calcium.

III - ETUDE DE L'ACTIVATEUR DE LA TPN-ase.

Il est facile de vérifier que les préparations de TPN-ase ci-dessus obtenues contiennent de la TPN-ase. Il suffit d'ajouter au milieu d'incubation un peu de la fraction qui reste en solution après avoir porté l'extrait brut de foie de pigeon à 100° pendant 2 min pour obtenir l'hydrolyse du TPN. Comme ces préparations contiennent la DPN-ase je préfère mettre en évidence le cofacteur sur une fraction qui en est dépourvue, fraction obtenue, comme il est signalé page 46, par la dénaturation thermique sélective. Ce traitement a en outre l'avantage de permettre, par dialyse, une séparation aisée de l'activateur.

Nous avons constaté (Voir fig. 3) qu'il était possible, par dialyse prolongée, de supprimer presque toute l'activité de la TPN-ase dans la fraction qui précipite entre 0 et 40 p. 100 de saturation au sulfate d'ammonium. L'addition d'un extrait de foie déprotéiné par ébullition restaure une partie de cette activité (Tableau VI).

Un résultat plus net est obtenu de la façon suivante : L'extrait brut de poudre acétonique de foie de pigeon est porté à 57° pendant 5 min puis rapidement refroidi dans de la glace pilée. Le surnageant obtenu après centrifugation de 10 min à 20 000 g, dépourvu de DPN-ase, est additionné de sulfate d'ammonium pulvérisé, à raison de 350 mg par ml (50 p. 100 de saturation). Le précipité qui se forme est recueilli par centrifugation de 20 min à 20 000 g et dissous dans 5 ml d'eau. Cette fraction dialysée 6h.

Tableau VI

Action d'un extrait de foie bouilli
sur l'activité de la TPN-ase dialysée

Fraction	TPN-hydrolysé		activité p.100 retrouvée
	0 cofacteur	mmoles + cofacteur	
Préparation enzymatique	238		
dialysée 3 heures	239	241	100
" 6 "	190	235	98
" 12 "	63	208	87
" 18 "	35	172	72
" 24 "	14	157	66

Conditions expérimentales :

Ce sont celles qui sont reportées sous la Fig. 3 mais en présence du seul TPN (enzyme précipitée au sulfate d'ammonium puis dialysée).

Le cofacteur ajouté est contenu dans 0.2 ml de la préparation ci-dessous :

L'extrait brut est chauffé 5 min à 100° pour éliminer l'activité enzymatique, puis centrifugé. Le surnageant est utilisé tel quel et contient l'activateur.

contre 2 l de Tris 0.61 M à pH 7.4 n'hydrolyse ni le DPN ni le TPN. L'activité de la TPN-ase est restaurée par addition de la partie soluble de l'extrait de foie portée à 100° (Tableau VII).

La préparation enzymatique traitée à 57° permet également la mise en évidence de l'adsorption du cofacteur sur le gel de phosphate de calcium. Avec de petites quantités de gel, 1 mg de poids pour 2 mg de protéine en solution, il est possible d'adsorber relativement plus de cofacteur que d'enzyme, le surnageant de centrifugation contient la TPN-ase, peu active. L'addition de l'extrait de foie bouilli accroît l'activité enzymatique (Tableau VIII).

Les expériences décrites montrent le rôle activant d'un facteur contenu dans les extraits de foie. Il s'agit d'un facteur thermostable, dialysable, lié, au moins en grande partie, aux protéines puisqu'il ne dialyse pas totalement. Sa liaison avec les protéines devient labile à la suite de la précipitation de l'enzyme par le sulfate d'ammonium; elle est encore plus facilement scindée sous l'effet de la chaleur; ces deux traitements permettent la dialyse totale de l'activateur et permettent son adsorption sur gel de phosphate de calcium.

Recherches préliminaires sur les propriétés de l'activateur

Dans l'obligation où je me trouvais de disposer de suffisamment d'activateur pour étudier la TPN-ase, j'ai effectué un travail préliminaire qui facilitera les recherches ultérieures d'identification.

Les TPN-ases de foie de Pigeon, de Rat, de Poule et de Mouton ont été dissociées par dialyse en deux fractions, une fraction protéique non dialysable, inactivée à 100° et une fraction dialysable, thermostable. L'activateur obtenu à partir de l'un quelconque de ces foies permet d'activer toutes ces TPN-ases. On peut donc admettre que le cofacteur est le même dans tous les cas étudiés.

Tableau VII

Influence de l'extrait de foie bouilli
sur l'activité de la TPN-ase
partiellement purifiée et dialysée

Substrat	TPN ou DPN hydrolysé μ moles	
	sans activateur	avec activateur
T P N	0	152
D P N	0	0
T P N + D P N	0	145 T P N 0 D P N

Conditions expérimentales

Préparation de l'enzyme décrite dans le texte, page 49
l'activateur est préparé et utilisé dans les conditions décrites
sous le tableau VI.

Chaque essai contient : pyridine-nucléotide indiqué
dans le tableau, 300 μ moles; Tris pH 7.4, 60 μ moles, enzyme
contenue dans 0.2 ml. L'activateur, lorsqu'il est ajouté, est
contenu dans 0.2 ml.

Volume final 1.2 ml. Incubation de 40 min à 37°.

Tableau VIII

Influence de l'extrait de foie bouilli sur
l'activité de la TPN-ase portée à 57° puis
traitée au gel de calcium

Fraction utilisée	TPN hydrolysé mμmoles
Enzyme porté à 57°	248
Surnageant gel de Ca	28
Activateur seul	0
Surnageant gel de Ca + activateur	112

Conditions expérimentales

L'extrait enzymatique brut de Pigeon, traité 5 min à 57° donne un surnageant de centrifugation contenant 9.8 mg de protéine par ml. A 5 ml de cette préparation (49 mg de protéines), on ajoute 1 ml de gel de phosphate de calcium (à 29.2 mg de poids sec par ml), après 10 min d'agitation, le mélange est centrifugé 10 min à 20 000 g. Le nouveau surnageant est utilisé à raison de 0.2 ml par expérience réalisée en présence de 300 mμmoles de TPN dans les conditions habituelles; les résultats ne tiennent pas compte de la dilution de l'enzyme à la suite de l'adsorption de l'activateur sur gel de Ca.

Les extraits enzymatiques bruts examinés contiennent plus d'activateur qu'il n'est nécessaire pour activer la TPN-ase présente. Cet excès d'activateur peut être mis en évidence à l'aide d'enzyme dialysée de Pigeon : l'activité du mélange enzyme brute plus enzyme dialysée, mesurée par la quantité de TPN hydrolysé (255 μ moles), est supérieure au total des activités de chacune des préparations séparées (148 + 41 = 189 μ moles). Cet excès est cependant limité puisque l'activité du mélange des enzymes brute et dialysée est accrue par addition d'activateur (296 μ moles au lieu de 255). Ces résultats sont reportés sur la figure 4.

La détermination quantitative de l'excès d'activateur n'est pas simple, cela pour deux raisons. En premier lieu, les préparations utilisées contiennent également des inhibiteurs de la TPN-ase. En second lieu, l'activité de l'enzyme n'est pas directement proportionnelle à la quantité d'activateur.

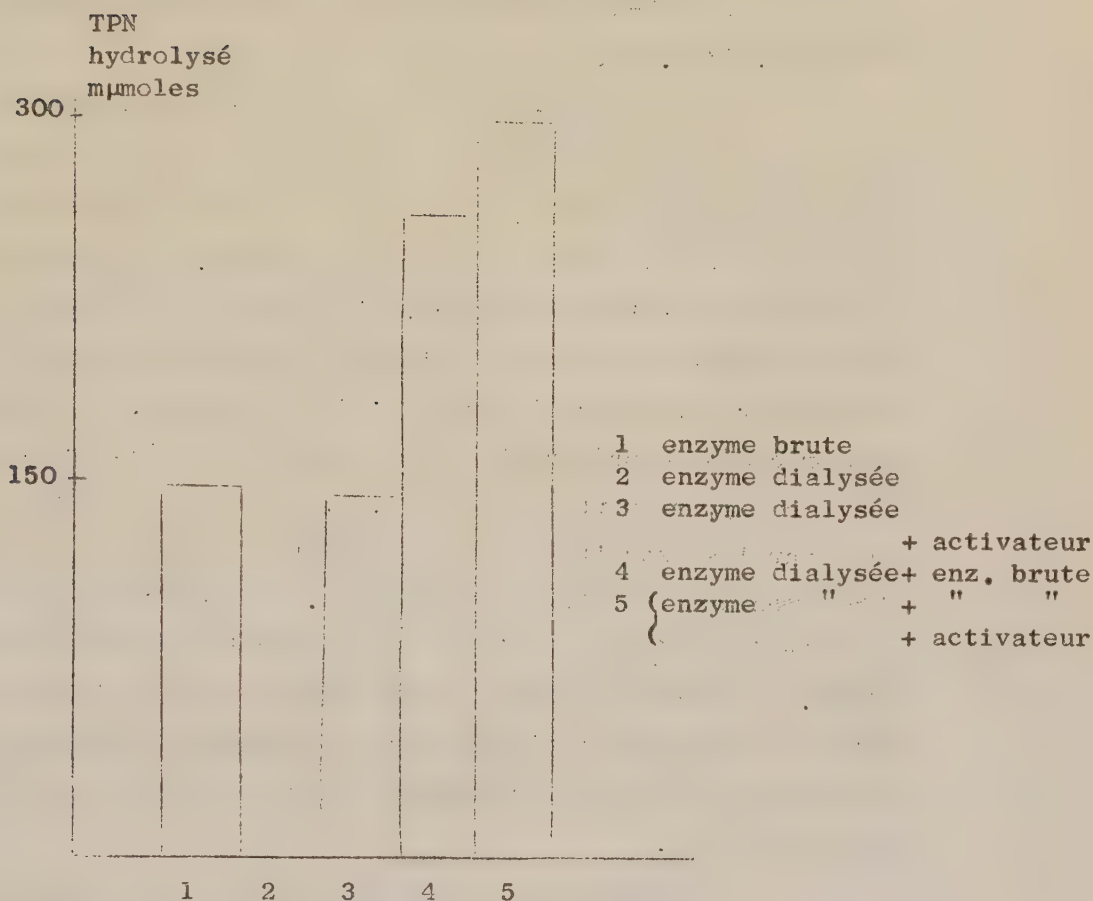
Présence d'inhibiteurs de la TPN-ase dans les extraits bouillis.

Lorsque j'ai voulu préparer une grande quantité de solution d'activateur, j'ai essayé d'utiliser un foie frais de lapin, sans passer par le stade de la poudre acétonique. Cette différence dans le mode de préparation m'a permis d'obtenir un résultat inattendu : l'addition de cet extrait de foie, au lieu d'activer la TPN-ase, inhibait l'activité enzymatique.

Le foie prélevé sur l'animal aussitôt après le sacrifice, est broyé, à l'aide d'un homogénéisateur, dans 10 fois son poids de solution de Tris 0.05 M à pH 7.4. Le broyat est ensuite versé dans un récipient plongé dans un bain-marie bouillant; la préparation est maintenue dans le bain-marie 3 min de plus que le temps nécessaire pour que la température atteigne 90°. Les protéines coagulées sont éliminées par 20 min de centrifugation à 20 000 g. Le surnageant est trouble et contient encore des protéines que l'on précipite par addition de ClH N, goutte à goutte, en quantité suffisante pour amener la solution à pH 2.5 - 3. Une nouvelle centrifugation donne un surnageant limpide, qui sera utilisé après neutralisation pour les expériences décrites dans la figure 5.

Figure 4

Présence d'un excès d'activateur de la TPN-ase
dans les extraits bruts de poudre acétonique
de foie



Conditions expérimentales

L'extrait enzymatique brut de Pigeon est préparé comme pour les expériences déjà décrites (voir Fig. 3); l'extrait dialysé provient du surnageant de centrifugation de l'extrait brut porté 5 min à 57° et dialysé 16h.

Chaque incubation comporte 0.5 µmole de TPN, 60 µmoles de Tris, pH 7.4, l'enzyme brute, l'enzyme dialysée, l'activateur sont contenus chacun dans 0.15 ml de préparation.

Volume final 1.2 ml.

Incubation de 40 min à 37°

Dosages enzymatiques

L'inhibition de la TPN-ase est encore plus importante si nous utilisons une solution d'activateur préparée à partir du foie de Boeuf vendu à la boucherie. Au lieu d'une inhibition croissant avec la quantité de solution utilisée, nous avons une inhibition totale de la TPN-ase dès l'addition d'une faible quantité d'extrait de boeuf. (Fig. 5).

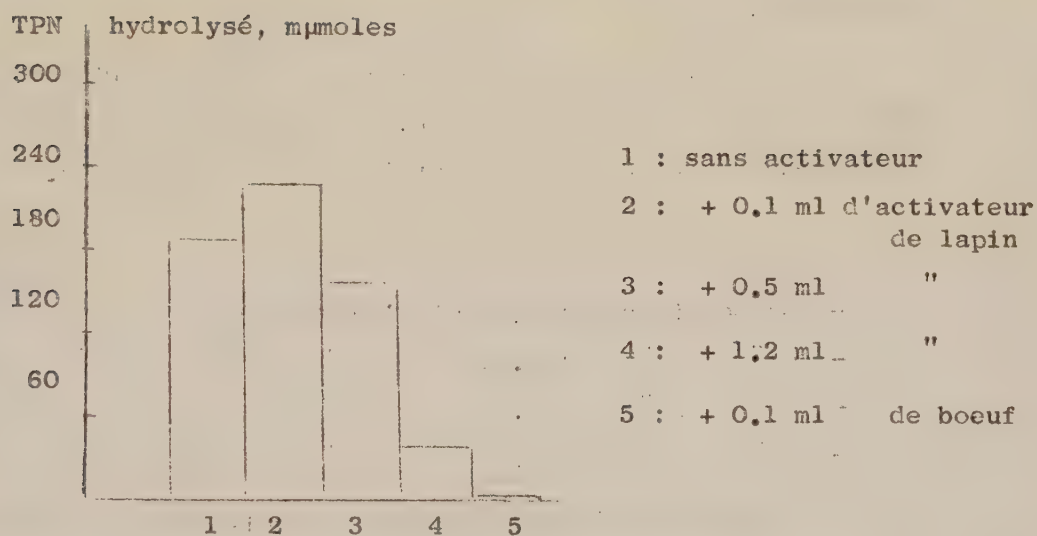
Quelle peut être la nature de l'inhibiteur? Une réponse partielle est donnée par la mesure de l'absorption à 280 et 260 m μ des préparations effectuées à l'aide de poudre acétonique de foie de Pigeon et des foies de Lapin et de Boeuf. A concentration égale de substance fraîche au départ, l'absorption est plus importante pour l'extrait de foie de Lapin que pour celui de Pigeon et encore plus importante pour l'extrait de foie de Boeuf. En tenant compte des procédés de préparation et du rapport de l'absorption à 280 m μ et à 260 m μ , rapport voisin de 0.25, nous pouvons dire que l'inhibition par les extraits de foie de Boeuf et de Lapin provient de la forte teneur en dérivés nucléotiques. Ces extraits ont en commun d'avoir été préparés à l'aide de foie frais et non de poudre acétonique. L'extrait de Boeuf a été préparé avec du foie ayant déjà subi un commencement d'autolyse; en particulier ribonucléase et désoxyribonucléase ont certainement hydrolysé une partie des acides nucléiques (1).

A l'inverse, la plus grande partie des nucléotides normalement présents dans le foie est éliminée au cours de la préparation des poudres acétoniques. Bien entendu, il ne peut s'agir que d'une présomption, présomption renforcée par le fait que l'ADP 5×10^{-3} M inhibe la TPN-ase; sur la base de l'absorption mesurée à 260 m μ et à 280 m μ ; cette concentration est compatible avec l'explication précitée

(1) Les inhibiteurs ne sont pas propres aux foies de lapin et de boeuf : une préparation d'activateur obtenue à partir de foie de Pigeon resté une heure à la température du laboratoire inhibe fortement la TPN-ase. Une décoction de levure de bière, ajoutée à une incubation, aboutit au même résultat.

Figure 5

Inhibition de la TPN-ase par les extraits
de foie frais



Conditions expérimentales

La préparation des activateurs de foie de lapin et de Boeuf est décrite dans le texte, page 56.

Chaque incubation contient 0.5 μ mole de TPN; 60 μ moles de Tris pH 7.4; l'enzyme brute est contenue dans 0.2 ml. La quantité d'activateur est indiquée pour chaque expérience.

Volume final 1.5 ml.

Incubation de 40 min à 37°.

Dosages enzymatiques.

Dosage et purification de l'activateur.

Les solutions d'activateur préparées à partir des poudres acétoniques du foie de Pigeon et de Rat n'inhibent pas la TPN-ase aux doses usuelles. Il devient donc possible, en adoptant une activité enzymatique de référence, dans des conditions données, de définir une unité d'activateur. L'unité d'enzyme sera la quantité de protéines qui hydrolyse 100 μ moles de TPN par heure à 37°; une unité d'activateur sera la quantité de substance qui permet l'hydrolyse de 50 μ moles de TPN par unité d'enzyme dans les mêmes conditions expérimentales.

L'extrait chauffé et dialysé de foie de Pigeon, préparé et utilisé comme décrit sous la Fig. 4, a donné les résultats suivants en présence de concentrations croissantes d'activateur.

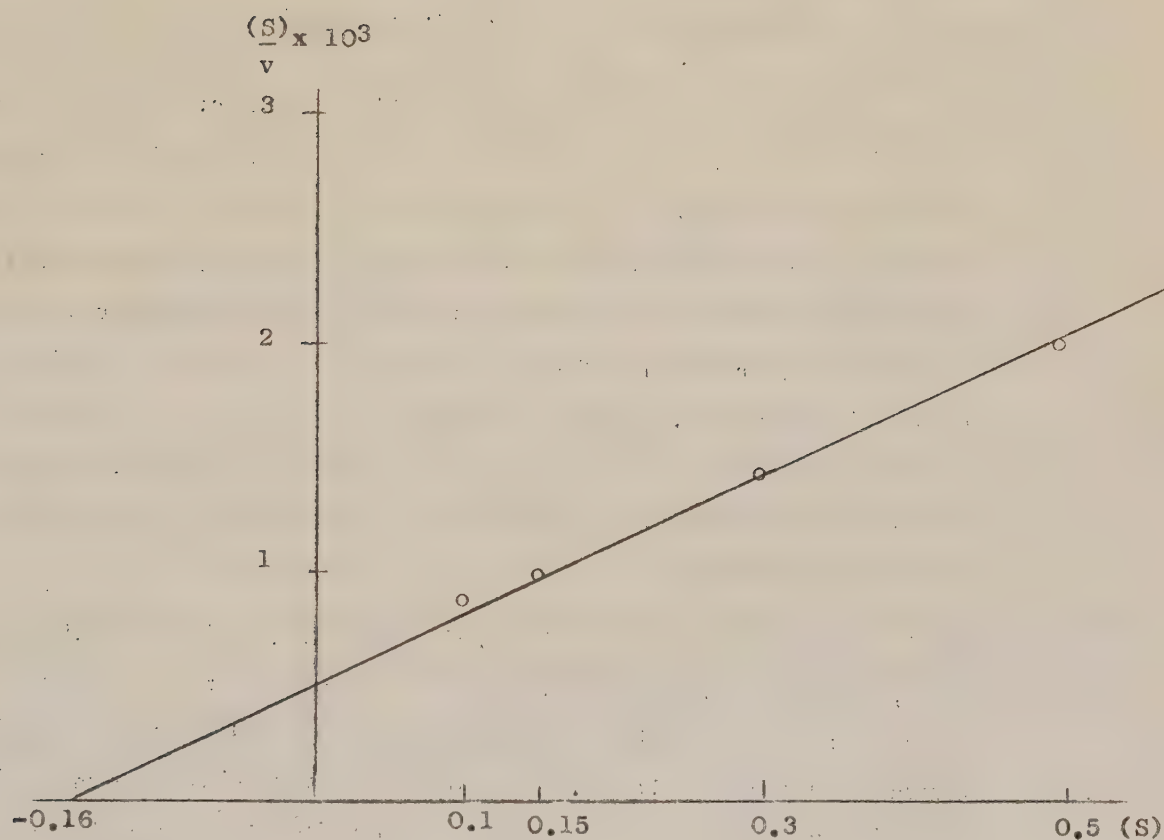
	TPN hydrolysé μ moles
- enzyme dialysée + 0.10 ml d'activateur	118
- " " + 0.15 "	155
- " " + 0.30 "	213
- " " + 0.50 "	230

Bien que l'enzyme dialysée ne soit pas totalement dépourvue d'activité en l'absence d'activateur, il est possible de trouver la vitesse d'hydrolyse maximum pour la quantité d'enzyme présente dans le tube d'incubation. Les résultats permettent de construire la courbe d'activité en fonction de la concentration en activateur.

Plus exactement, le rapport du volume de la solution d'activateur utilisé à la vitesse d'hydrolyse, ou (S^1) , est porté en ordonnée et le volume de la solution, (S) , en abscisse. Cette représentation identique à celle utilisée pour la détermination de la Constante de Michaelis, selon LINEWEAVER et BURK (1934), permet d'obtenir directement le volume de la solution d'activateur pour lequel la vitesse d'hydrolyse sera la moitié de la vitesse maximum. La droite qui passe par les points définis donne cette valeur, au signe près, à son intersection avec l'abscisse (DIXON, 1953). Dans le cas présent, il aurait suffi de 0.16 ml de solution d'activateur par incubation (Fig. 6).

Figure 6

Influence de la quantité d'activateur
sur la vitesse d'hydrolyse



(S), représente, en ml, le volume d'activateur, ajouté aux incubations.

(v), quantité en mmoles de TPN hydrolysé, au cours de l'incubation.

A partir des résultats expérimentaux, compte tenu de la durée de l'incubation, on peut calculer que chaque tube contenait 4.57 unités d'enzyme; il y a donc 4.57 unités d'activateur par 0.16 ml de solution, soit 26.8 unités par ml.

Les tentatives de purification de l'activateur ont pu être suivies en rapportant les résultats à un volume fixé. La poursuite du travail entraînera nécessairement un autre mode d'expression; il faudra déterminer la quantité de substance organique présente, par exemple, à l'aide de l'oxydation sulfochromique (J. HANSON, 1949).

L'activateur est totalement détruit par minéralisation sulfurique et par calcination à 500°. Il est inactivé en milieu alcalin et relativement stable en milieu acide. Après avoir été portée 10 min à 100°, en présence de soude 0.1 N, la solution inhibe fortement l'activité enzymatique; cette inhibition ne provient peut-être pas des produits de l'hydrolyse alcaline de l'activateur; elle peut, en effet, avoir pour origine les substances qui l'accompagnent et qui sont également hydrolysées.

L'activateur est entièrement retenu par les résines Dowex 1 et Amberlite IRA 401 qui fixent les anions, au contraire, une colonne de résine Amberlite IR 120 enlève les cations de la solution, sans retenir l'activateur.

Les solutions utilisées pour étudier la TPN-ase de foie ont été finalement préparées comme suit :

1 g de poudre acétonique de foie de Rat ou de Pigeon est homogénéisé dans 20 ml de Tris 0.05 M, pH 7.2. L'homogénat est porté à 100°, centrifugé, acidifié, puis à nouveau centrifugé pour éliminer le coagulum; ces opérations sont décrites page 54 à propos de l'activateur extrait du foie de Lapin. La purification à l'aide de la résine est effectuée en faisant passer la solution acide sur une colonne d'Amberlite IR 120 activée par H_2SO_4 2 N et lavée à l'eau distillée. La colonne est une burette d'un diamètre intérieur de 11 mm qui contient 6 ml de résine calibrée au tamis 200 à 400 mesh. L'écoulement est réglé à 20 gouttes par min (1.2 ml/min).

Quand toute la solution est passée, la colonne est rincée par

5 ml d'eau distillée. Les liquides sont réunis et neutralisés; on y dose le cofacteur, puis la solution est concentrée sous vide, ou au contraire diluée, pour être standardisée à 30 unités de cofacteur par ml; elle est ensuite répartie en fractions de 5 ml qui seront conservées congelées jusqu'au moment de l'utilisation. L'activateur ainsi préparé a pu être conservé plusieurs mois sans modification.

Remarques

J'ai toujours utilisé le terme activateur ou cofacteur au singulier. En fait, il ne s'agit que d'un effet global, lequel peut correspondre à la présence de plusieurs corps définis différents mais tous nécessaires. Les résultats expérimentaux ne permettent pas de préciser davantage cette possibilité; nous ne l'avons pas perdue de vue. (1)

A la concentration finale de 1×10^{-3} M, aucune des substances suivantes n'a pu remplacer l'activateur : alamine, acide aspartique, cystéine, ergothionéine, acide glutamique, glycocolle, leucine, proline, thréonine (tous sous la forme L).

Un hydrolysât total de caséine 1×10^{-3} M en azote organique est également sans influence. De même les vitamines et dérivés des vitamines suivants sont sans action : riboflavine, flavine monophosphate et flavine adénine dinucléotide (1×10^{-5} M); thiamine, thiamine-pyrophosphate, pyridoxal-phosphate (1×10^{-3} M); cyanocobalamine (100 µg/ml). Nous avons également essayé, sans succès, les nucléotides dérivés de l'adénine et de la guanine AMP, GMP, ADP, GDP, ATP et GTP (concentration finale 1×10^{-5} M).

(1) Les essais relatifs à la purification de l'activateur ont été entrepris, après fixation sur l'Amberlite IRA 401. L'élution à l'aide de HCl à concentration croissante n'a pas toujours donné des résultats reproductibles, et la perte en activateur est considérable. D'autre part, les sels introduits au cours des opérations inhibent, même à faible concentration, l'activité de la TPN-ase. KINSKY, STADTMAN et MACLAY (1961) ont rapporté des faits semblables à la suite de leurs travaux sur la purification du cofacteur nécessaire à la réduction du DPN par l'hydrogène, en présence d'extraits de *Clostridium Kluyveri*.

IV - ETUDE DE LA TRIPHOSPHOPYRIDINE-NUCLEOTIDASE

Purification partielle de la TPN-ase du foie de Pigeon

J'ai consacré beaucoup de temps à cette purification et utilisé un grand nombre de techniques les plus diverses comme la précipitation au sulfate d'ammonium, le fractionnement à l'acétone, à l'alcool, l'adsorption sélective sur gel de calcium et alumine C et la chromatographie sur diéthylaminoéthylcellulose (DEAEC).

Aucune méthode ne s'est révélée efficace malgré l'addition de glutathion ou de versène (EDTA) dans l'espoir d'une protection éventuelle; toutes aboutissent à d'importantes pertes en activité totale, sans gain en activité spécifique. La seule exception sur ce dernier point est fournie par le traitement au gel de calcium, dans la mesure où la TPN-ase n'est pas adsorbée; employé en trop grande quantité, le gel de calcium adsorbe la TPN-ase; l'élution à l'aide des solutions salines de phosphate, pyrophosphate, citrate n'aboutit qu'à des rendements catastrophiques. Nous verrons que les résultats ont été plus encourageants avec la pyridine-nucléotidase du sperme.

En résumé, seules l'inactivation thermique d'une partie des protéines (dont toute la DPN-ase) et l'adsorption sélective de protéines étrangères sur gel de calcium, sont utilisables. Bien que le fractionnement au sulfate d'ammonium conduise à une perte en activité totale et spécifique, j'ai utilisé cette opération car elle permet une meilleure purification ultérieure.

Toutes les manipulations se font à froid, entre 0 et 4°; les centrifugations sont effectuées à 20 000 g : les protéines sont déterminées par la méthode spectrophotométrique.

L'unité enzymatique est la quantité de protéines qui catalyse l'hydrolyse de 100 μ moles de TPN en 60 min; l'activité spécifique est le nombre d'unités par mg de protéines.

Préparation de l'extrait brut :

2 g de poudre acétonique de foie de Pigeon sont homogénéisés dans 40 ml de tampon Tris-maléique, 0.05 M à pH 7.4, au moyen de l'homogénéisateur de Potter et Elvehjem.

Après 15 min d'attente, le mélange est centrifugé 20 min. Le surnageant constitue l'extrait brut d'une couleur rouge sombre.

Inactivation thermique de la DPN-ase :

La technique utilisée est semblable à celle qui a servi à déterminer la constante d'inactivation de la TPN-ase (Cf. p.48), mais le deuxième bain est à 57°. L'extrait brut est maintenu deux minutes à cette température. Après ce délai, la préparation est immédiatement refroidie dans de la glace pilée. Le précipité formé est éliminé par 20 min de centrifugation. Le surnageant rouge, limpide, constitue la fraction appelée surnageant à 57°.

Fractionnement au sulfate d'ammonium :

Le surnageant à 57° est porté à 30 p. 100 de saturation par addition de 210 mg/ml de sulfate d'ammonium; le sel pulvérisé est ajouté par petites fractions sous agitation continue. L'agitation est maintenue pendant 15 min. Une centrifugation de 20 min permet l'élimination des protéines précipitées. Le surnageant est ensuite porté à 50 p. 100 de saturation par l'addition de 140 mg/ml de sulfate d'ammonium, dans les conditions précédentes. Après 15 min d'agitation, une nouvelle centrifugation de 20 min permet de recueillir le précipité. Après addition de 10 ml d'eau, on obtient la fraction, qui sera la fraction 30-60.

Traitement au gel de calcium

La fraction 30-60 est dialysée 4h. contre la tampon Tris-maléique 0.01 M, pH 7.4, avec agitation magnétique. Le tampon est renouvelé toutes les heures. Le produit dialysé est ensuite additionné de gel de calcium, préparé suivant KEILIN et HARTREE (1938) en quantité suffisante pour qu'à chaque mg de protéine correspondent 2 mg

de poids sec de gel. A 12 ml de la fraction 30-60, nous ajoutons 20 ml d'un gel de calcium âgé de 13 mois (21.4 mg/ml de poids sec). Le mélange est agité 15 min, puis centrifugé.

Le surnageant, qui sera le surnageant calcium, contient l'essentiel de l'activité enzymatique. Dans le tableau IX, nous rassemblons les résultats obtenus au cours d'une telle purification.

Remarque

D'une façon générale, les diverses purifications ont donné des résultats semblables; l'activité spécifique de l'extrait brut varie selon les préparations de 1.2 à 3.6 et la plus grande activité spécifique atteinte est de 10.7.

Nous pouvons constater que le chauffage à 57° est d'un excellent rendement, ce qui n'est pas le cas de la précipitation au sulfate d'ammonium. En recueillant les diverses fractions qui précipitent entre 0 et 30, 30 et 60, 60 et 80 p. 100 de sulfate d'ammonium, nous ne retrouvons jamais l'activité enzymatique d'origine. La fraction la plus riche, comprise entre 30 et 60 p. 100 de saturation perd au moins la moitié de l'activité totale du surnageant à 57° et l'activité spécifique est diminuée. La dialyse avant le traitement au gel de calcium est nécessaire pour éliminer le sel d'ammonium qui gêne l'adsorption des protéines étrangères.

La dialyse est d'autre part nécessaire pour mesurer l'activité de l'enzyme; nous verrons que cette dernière est inhibée même à des concentrations salines relativement faibles; en particulier pour les sels d'ammonium (cf. p.70). L'usage du sulfate d'ammonium est cependant maintenu car il permet d'obtenir une enzyme totalement dépourvue d'activateur et l'activité spécifique finale est plus élevée.

Propriétés de l'enzyme

Stabilité

Contrairement aux pyridine-nucléotides du sperme, du cerveau et de la rate, la TPN-ase du foie de Pigeon s'inactive rapidement. En

Tableau IX

Purification de la triphosphopyridine-nucléotidase
du foie de Pigeon

Fraction	Volume total ml	Protéines mg/ml	Protéines totales mg	Activité totale Unités	Activité spécifique	p.100 de l'activité totale
Extrait brut	35	21.3	746	2 020	2.7	100
Surna- geant 57°	33	11.8	390	1 990	5.1	93
Fraction 30-60	12	18.3	220	870	3.9	43
Surnageant calcium	31	2.49	72	625	3.7	31

Conditions expérimentales

Chaque tube contient : TPN 0.5 μ mole ; tampon Tris pH 7.5, 60 μ moles, fraction enzymatique étudiée, 4 à 5 unités; activatueur, 0.2 ml (6 unités).

Volume final 1.2 ml.

Après 20 min d'incubation à 37°, les dosages sont effectués par la méthode au cyanure.

3 à 4 jours, si la solution est conservée à 0°, en une semaine si elle est congelée, toute l'activité est perdue; l'addition de cystéine et de glutathion, 10^{-3} M, n'a aucune influence. Une part de l'inactivation provient certainement de la faible concentration en enzyme, mais le surnageant préparé à 57°, bien que plus concentré, est également inactivé en quelques jours à 0°.

L'enzyme est complètement inactivée à 80° en 2 min, cependant qu'à 57° en 2 min on ne constate aucune diminution d'activité.

Spécificité et pureté.

L'enzyme n'hydrolyse que le TPN. Les substances suivantes ont été essayées : le DPN, le MNM, le DPNH et le TPNH; aucune n'est hydrolysée.

La préparation est exempte de phosphatase, de DPN-pyrophosphatase ou d'autres enzymes qui inactivent le TPN; les résultats obtenus par la méthode au cyanure et par la méthode enzymatique sont absolument concordants.

Influence du pH.

Les mesures effectuées en présence de tampon Tris-maléique montrent une large zone d'activité située entre 6.2 et 7.7 (Fig. 7). En présence de tampon phosphate de potassium, l'activité est légèrement diminuée du fait de l'inhibition de l'activité enzymatique par les ions minéraux.

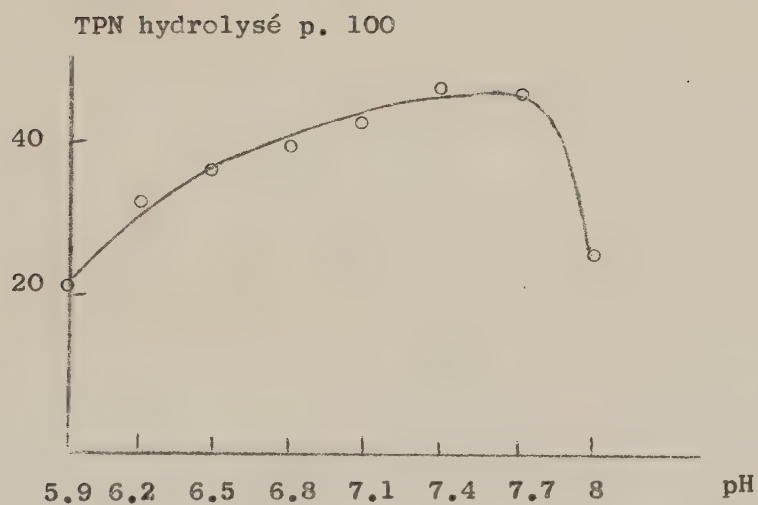
Activité en fonction de la concentration en protéines.

Dans les conditions expérimentales adoptées, la quantité de TPN hydrolysé en un temps donné est proportionnelle à la quantité de protéines présentes. La Fig..8 présente les courbes tracées à l'aide des résultats obtenus avec deux concentrations différentes de TPN en présence d'enzyme, purifiée au gel de calcium. Chaque tube contient, en plus des quantités indiquées de TPN et de protéines, 0.2 ml de solution d'activateur et du tampon Tris-maléique, pH 7.5, 0.05 M, dans 1.2 ml de volume final. Après 30 min d'incubation à 37°, les dosages sont effectués par la méthode au cyanure.

.....

Figure 7

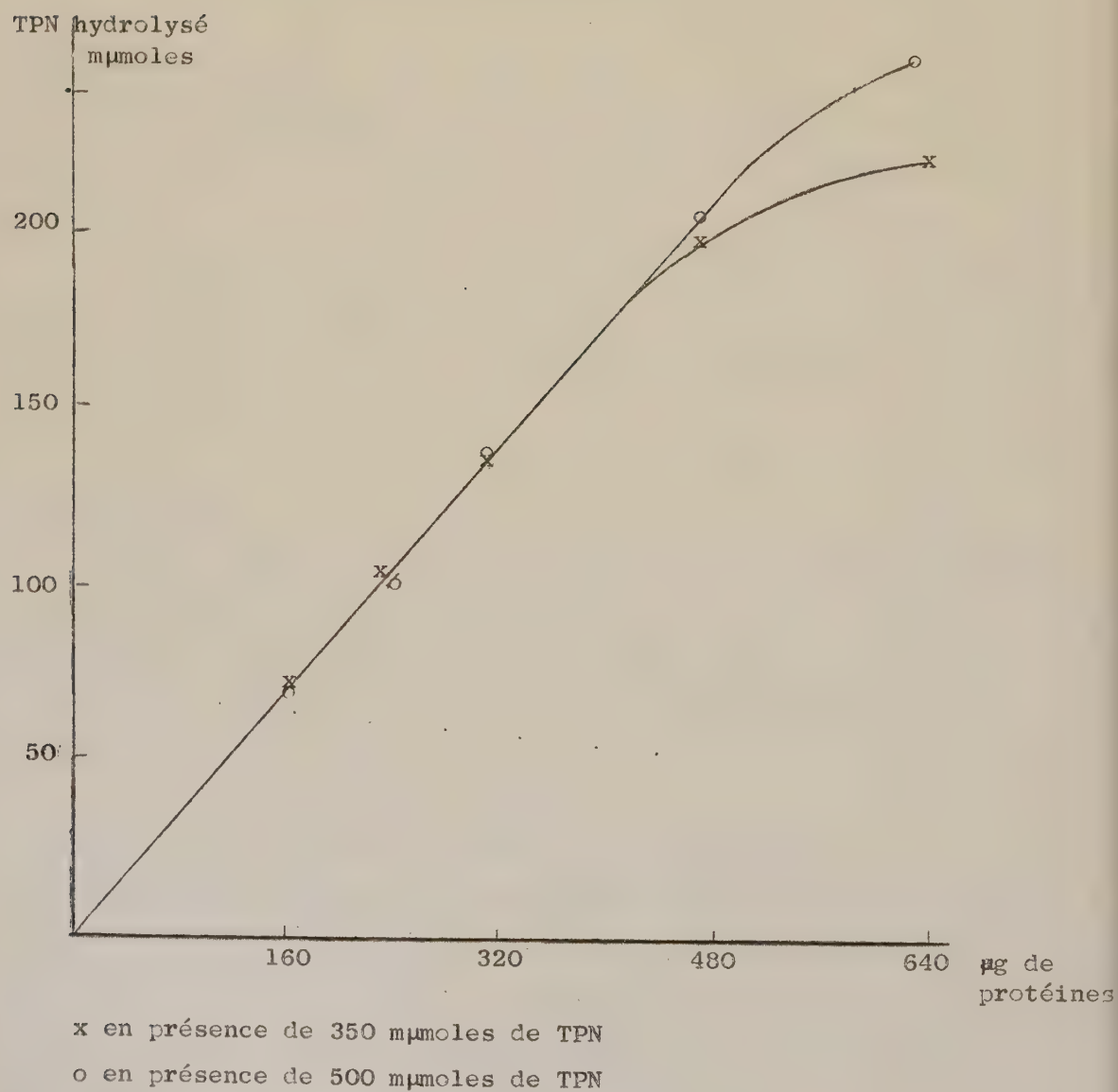
Activité relative en fonction du pH



Conditions des essais d'activité : seuls varient les pH
du tampon Tris-maléique.

Figure 8

Activité de la TPN-ase
en fonction de la concentration
en protéines



Influence de la concentration en substrat

Afin de déterminer la constante de Michaelis, les incubations ont été effectuées en présence de concentrations croissantes de TPN. Les résultats obtenus permettent de construire la courbe d'activité en fonction de la concentration initiale. Les conditions adoptées ont été les suivantes : concentration du TPN comprise entre 180 et 720 μ moles; enzyme en quantité suffisante pour hydrolyser environs les trois-quarts du substrat présent à la plus faible concentration, après 20 min d'incubation à 37°; tampon Tris-maléique pH 7.5, 0.05 M; volume final 1.2 ml.

Pour déterminer le K_s à partir des résultats fournis par l'expérience précédente, j'utilise un des modes de représentation préconisé par LINEWEAVER et BURK (1934), qui prennent la réciproque de l'équation de HENRI (1903) et de MICHAELIS et MENTEN (1913) :

$$(1^{\circ}) \quad v = \frac{V (S)}{K_s + (S)}$$

Sur la Fig. 9, les valeurs de $\frac{1}{(S)}$ sont portées en ordonnée, celle de $\frac{1}{v}$ en abscisse; on obtient ainsi une droite qui correspond à l'équation :

$$\frac{1}{v} = \frac{K_s}{V} \frac{1}{(S)} + \frac{1}{V}$$

L'intersection de la droite avec l'abscisse donne la valeur de $-\frac{1}{K_s}$

(DIXON, 1952), l'intersection avec l'ordonnée, celle de $\frac{1}{V}$.

Sur la Fig. 9, (S) représente la quantité de TPN à l'origine; v est

(°) v = vitesse de la réaction, déterminée expérimentalement, en présence d'une concentration (S) de substrat.

V = vitesse maximum de la réaction, en présence d'un très grand excès de substrat.

la quantité de TPN hydrolysé au cours de l'incubation. Ce graphique permet de déterminer la valeur de K_s :

$$1.9 (\pm 0.2) \times 10^{-4} \text{ M}$$

Activité en fonction de la température.

Entre 25 et 35°, le Q_{10} est de 1.8, mesuré après une incubation de : 2 min à pH 7.5.

Inhibition par la nicotinamide et les substances apparentées.

La caractéristique commune des pyridine-nucléotidases d'origine animale est d'être inhibée par la nicotinamide. Il en est de même pour la TPN-ase du foie de Pigeon.

En présence de 3.5×10^{-4} M de TPN, la nicotinamide 1.5×10^{-3} M et l'acétylpyridine 4×10^{-3} M inhibent 50 p. 100 de l'activité. Il faut une concentration de 10^{-3} M d'hydrazide de l'acide isonicotinique pour obtenir une inhibition de 10 p. 100.

Influence des ions minéraux.

Utilisés à la concentration de 0.04 M, les sels suivants ont inhibé l'activité enzymatique : ClK, ClNa, ClNH₄, SO₄(NH₄)₂.

Cette inhibition est différente suivant les ions; les ions SO₄⁼ et NH₄⁺ sont les plus actifs (Tableau X). On s'explique ainsi la perte d'activité au cours de la purification, la dialyse ne rétablit pas l'activité, il semble que la protéine enzymatique, particulièrement sensible à l'action de certains sels, soit partiellement dénaturée.

Cette inhibition se produit à des concentrations relativement élevées, mais qui sont celles que l'on rencontre quand on utilise les sels dans la confection des tampons ou au cours de purification.

A des concentrations plus diluées, les ions suivants se sont montrés sans influence sur la TPN-ase, à 1.10^{-3} M : Ca⁺⁺, Zn⁺⁺, Cu⁺⁺, Mn⁺⁺, Fe (CN)₆⁻⁻⁻; à 1.10^{-4} M : Hg⁺⁺.

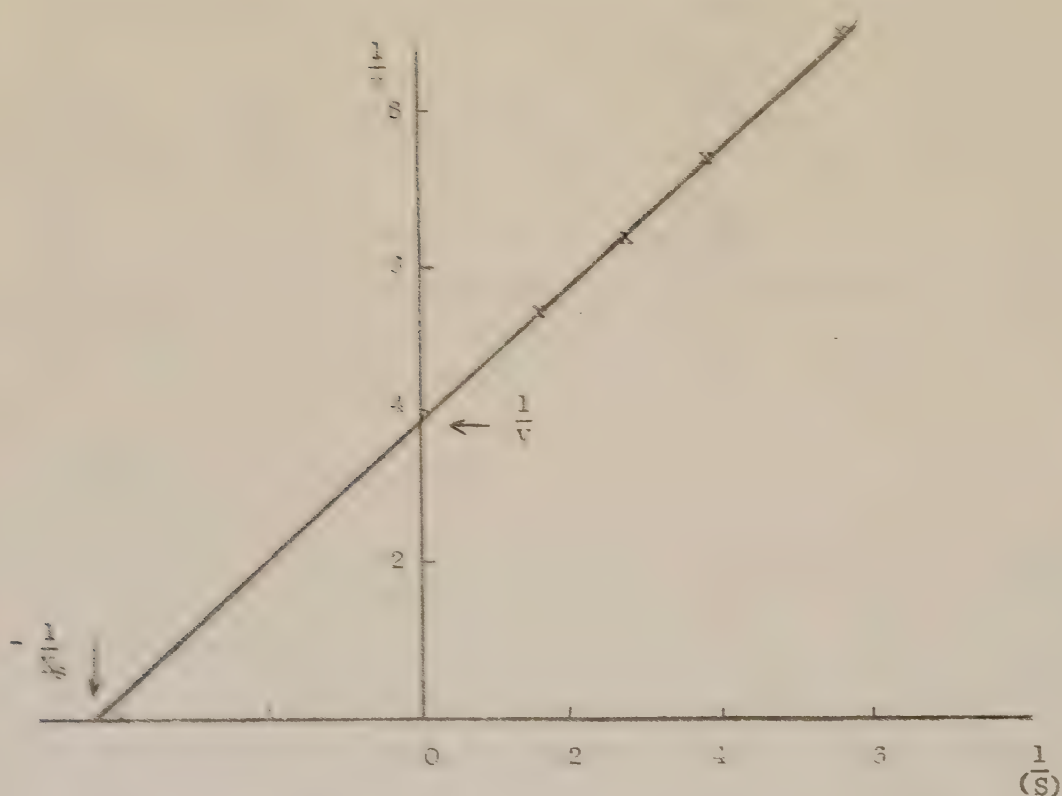
Tableau X

Inhibition de la TPN-ase par les sels minéraux

sel, conc. finale , 0.04 M	inhibition p. 100
KCl	5
NaCl	5
H ₂ KPO ₄	5
NH ₄ Cl	20
CaCl ₂	22
K ₂ SO ₄	39
(NH ₄) ₂ SO ₄	71

Figure 9

Hydrolyse du TPN par l'enzyme de foie de Pigeon
en fonction de la concentration en substrat.



Les valeurs de (S) sont exprimées en μmoles de TPN
présent au début de l'expérience ; celles de v , en μmoles de TPN
hydrolysé après 20 min d'incubation.

Influence de divers inhibiteurs.

Aucune inhibition significative n'a pu être constatée en présence d'EDTA et de diéthylldithiocarbamate à la concentration de 0.04 M. Ces essais ont été effectués en laissant incubé l'enzyme et en le complexant 30 min avant d'ajouter le substrat. Après arrêt de l'expérience, les dosages du TPN ont été faits par la méthode au cyanure.

Le p. chloromercuribenzoate (5×10^{-4} M) n'inhibe pas la TPN-ase, ce qui indique l'absence de groupes-SH fonctionnel dans la molécule protéique.

La phénosafranine, 3.10^{-3} M, est également sans action. Bien que Mc ILWAIN et RODNIGHT (1949 b) aient mis en évidence l'extrême sensibilité de la pyridine-nucléotidase du cerveau à des concentrations très faibles de phénosafranine, de l'ordre de 1×10^{-5} M, les études effectuées par divers auteurs sur les enzymes de la rate, des érythrocytes, de Neurospora, comme mes essais sur les enzymes du foie de Pigeon ou du sperme de Taureau, n'ont pas permis de retrouver cette inhibition.

L'inhibition de l'hydrolyse du TPN, par la cortisone et l'hydrocortisone, mise en évidence sur l'extrait brut de poudre acétonique, ne se retrouve plus après le chauffage de la préparation enzymatique.

Particularités concernant la TPN-ase du foie de Rat.

Le mode de purification décrit pour l'enzyme du foie de Pigeon a été utilisé pour les foies de Mouton et de Rat. La seule modification apportée vient de la plus grande thermolabilité des enzymes (Cf. p.48); le traitement thermique se fait donc à 50° pour l'extrait de foie de Rat.

La spécificité de la TPN-ase, le rôle de cofacteur ont été retrouvés; de même, les enzymes sont inactivées par les cations.

L'enzyme de foie de Rat se différencie de celle du foie de Pigeon par plusieurs points qui sont : l'auto-inhibition par des

concentrations peu élevées en substrat, la sensibilité à la nicotineamide et la synthèse du dérivé analogue au TPN en présence d'INH.

Inhibition par le substrat.

Les expériences effectuées en présence de quantités croissantes de TPN, en vue de déterminer la constante de Michaelis, ont permis de constater une inhibition de l'activité pour des concentrations sans influence par ailleurs sur la TPN-ase du foie de Pigeon.

Conditions expérimentales.

Chaque tube contient, en plus des quantités de TPN indiquées, 0.2 ml de solution de cofacteur, et 0.5 mg de protéines; tampon Tris-maléique pH 7.5, 0.06 M. Incubation de 10 min à 37°. Dosage au cyanure.

Les résultats reportés sur la Fig. 10 permettent de constater l'auto-inhibition.

Il est cependant possible de déterminer la constante de Michaelis en modifiant les conditions expérimentales habituelles; il faut suffisamment diminuer la concentration en TPN pour éliminer l'auto-inhibition et diminuer également la durée de l'incubation pour éviter l'hydrolyse totale du substrat.

Les conditions adoptées ont été les suivantes : concentration en TPN comprise entre 20 et 150 μ moles par ml, durée de l'incubation, 5 min, enzyme en quantité suffisante pour hydrolyser les trois quarts du substrat présent à la plus faible concentration (0.5 mg de protéines); tampon Tris-maléique pH 7.5, 0.05 M; volume final 1.2 ml.

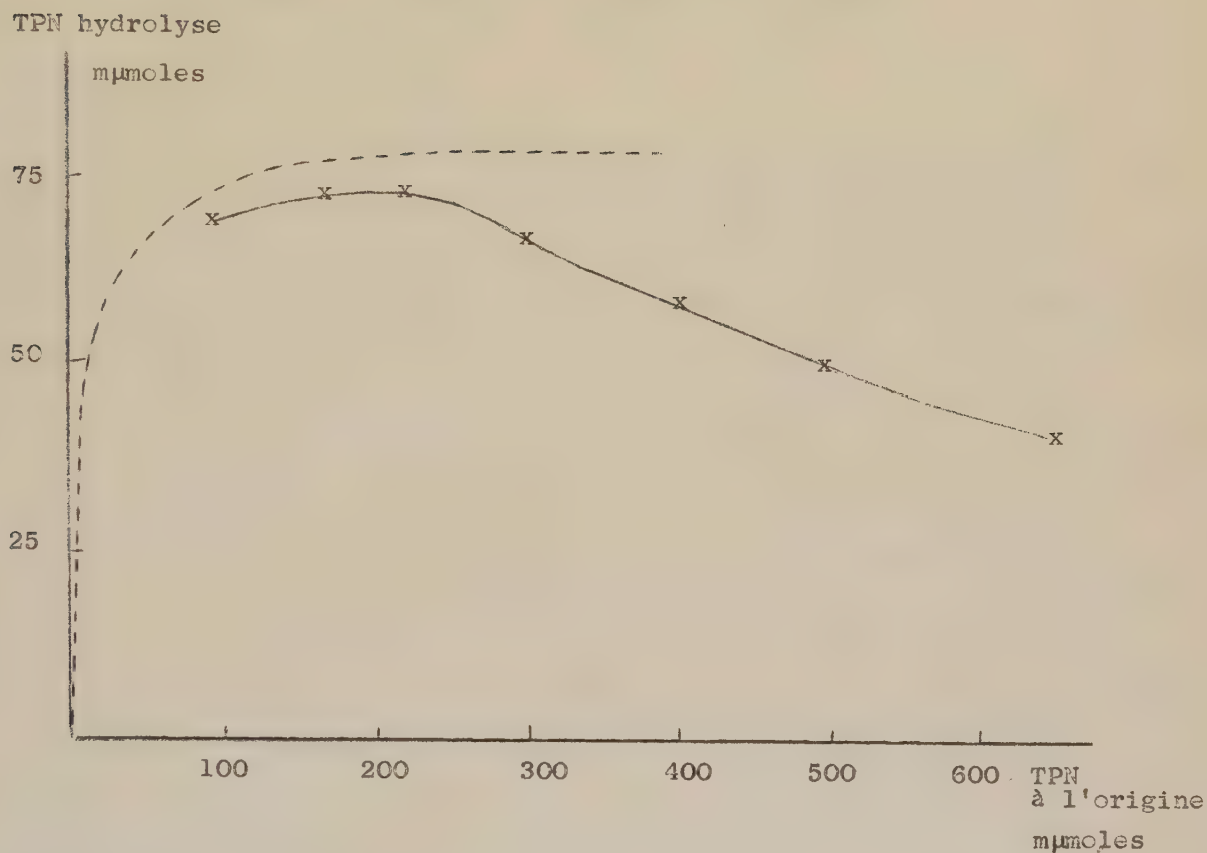
Le K_s est déterminé au moyen du mode de représentation préconisé par LINEWEAVER et BURK (1934). Sur la fig. 11, les valeurs de $\frac{(S)}{v}$ sont portées en ordonnée et celle de (S) en abscisse et on obtient ainsi une droite qui correspond à l'équation :

$$\frac{(S)}{v} = \frac{K_s}{V} + \frac{(S)}{V}$$

L'intersection de la droite avec l'abscisse donne directe-

Figure 10

Hydrolyse du TPN en fonction de la concentration
en substrat

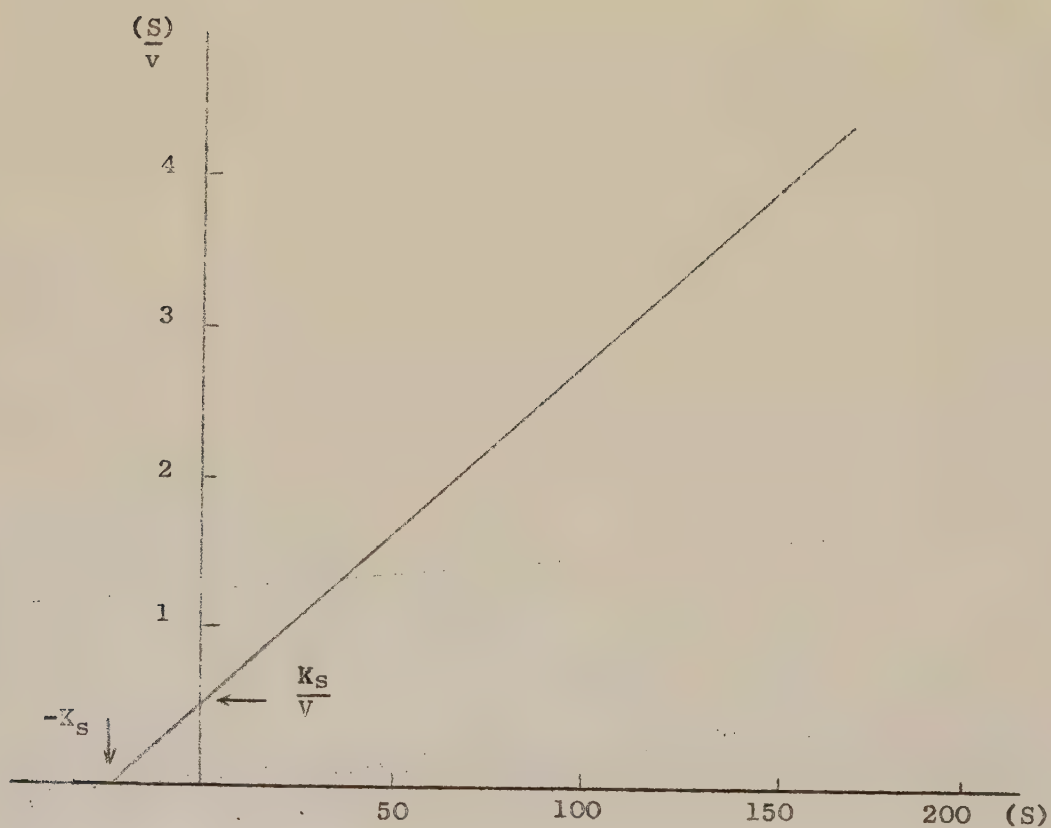


Incubation de 10 min à 37°

En pointillés : courbe théorique, en l'absence d'autoinhibition,
obtenue en extrapolant les résultats de la Fig. 11.

Figure 11

Détermination du K_S de la TPN-ase de foie de Rat



(S) mμmoles de TPN présent à l'origine dans un volume final de 1.2 ml.

v mμmoles de TPN hydrolysé en 5 min.

ment la valeur de K_s , l'intersection avec l'ordonnée donne la valeur de $\frac{K_s}{v}$ qui permet de calculer V , vitesse maximum d'hydrolyse.

A l'aide de cette représentation, on obtient :

$$K_s = 1.9 \times 10^{-5} \text{ M}$$

La moyenne des trois expériences différentes donne :

$$K_s = 2. (\pm 0.3) \times 10^{-5} \text{ M.}$$

Inhibition de la nicotinamide.

Deux séries d'expériences ont été effectuées en présence de nicotinamide. Dans la première, la concentration en nicotinamide était constante, seules variaient les concentrations en substrat; dans la seconde, la quantité de substrat était fixe, mais les concentrations en inhibiteur variaient.

Les premiers résultats, portés sur la figure 12, montrent que l'inhibition par la nicotinamide est de nature compétitive. Les seconds résultats permettent la construction de la Fig. 13. En ordonnée, sont portées les valeurs $\frac{v}{v_i}$, rapport des vitesses d'hydrolyse en présence d'inhibiteurs à différentes concentrations; en abscisse sont portées les concentrations en inhibiteur. Pour un rapport $\frac{v}{v_i} = 2$, la vitesse d'hydrolyse est réduite de moitié; cela correspond à une concentration en nicotinamide de $1.6 \times 10^{-4} \text{ M}$ pour une concentration de TPN = $2.9 \times 10^{-4} \text{ M}$.

Réaction transglycosidasique

Cette réaction particulièrement étudiée par ZATMAN et coll. (1954) a été retrouvée à l'aide de l'enzyme de foie de Rat. Les auteurs précités ont obtenu de nombreux analogues du DPN, rien ne s'oppose, a priori, à la formation d'analogues semblables du TPN. C'est effectivement possible en présence d'INH et de la TPN-ase du foie de Rat.

Les expériences ont été réalisées à l'aide de l'enzyme exempte de DPN-ase, mais non précipitée au sulfate d'ammonium; TPN, $5 \times 10^{-4} \text{ M}$, seul, ou en présence de $5 \times 10^{-3} \text{ M}$ d'INH; tampon Tris-maléique pH 7.5; volume final 1.2 ml.

Figure 12

Inhibition de la TPN-ase du foie de Rat
par la nicotinamide

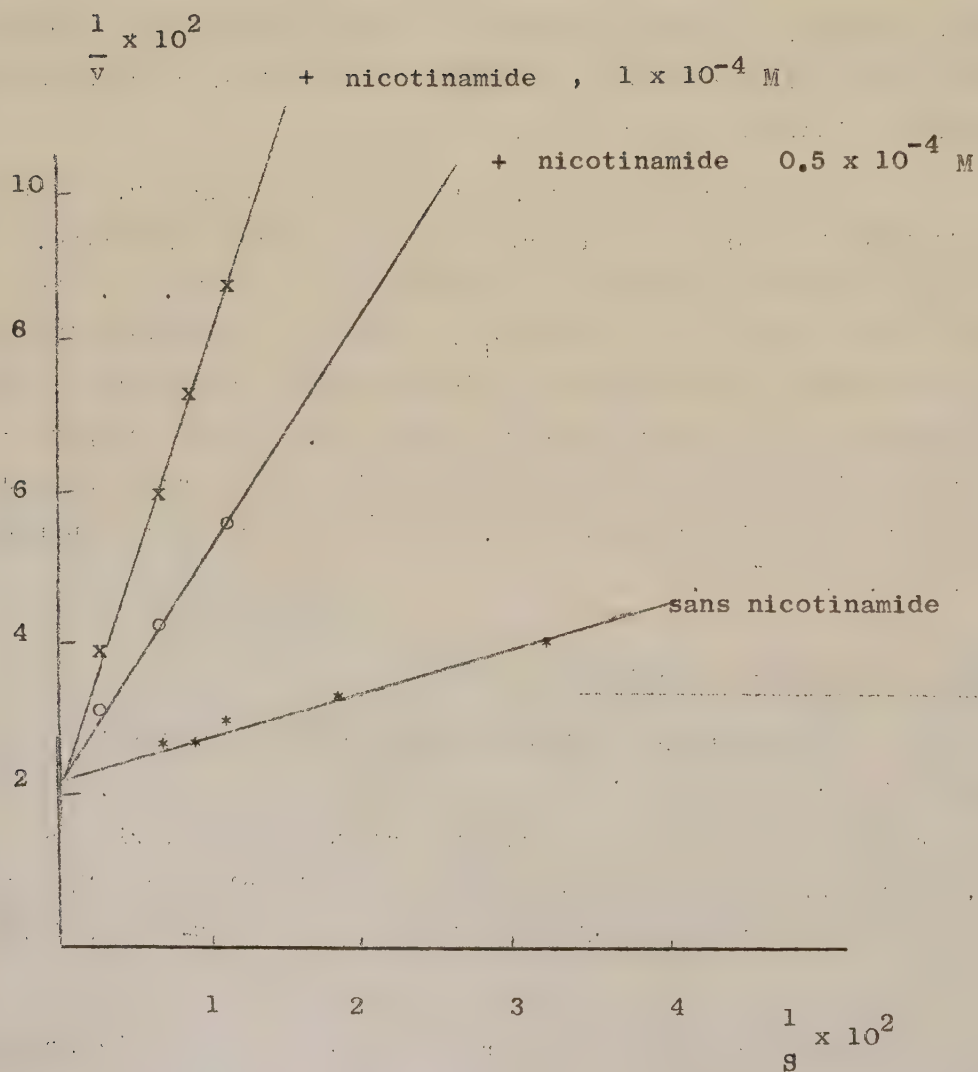
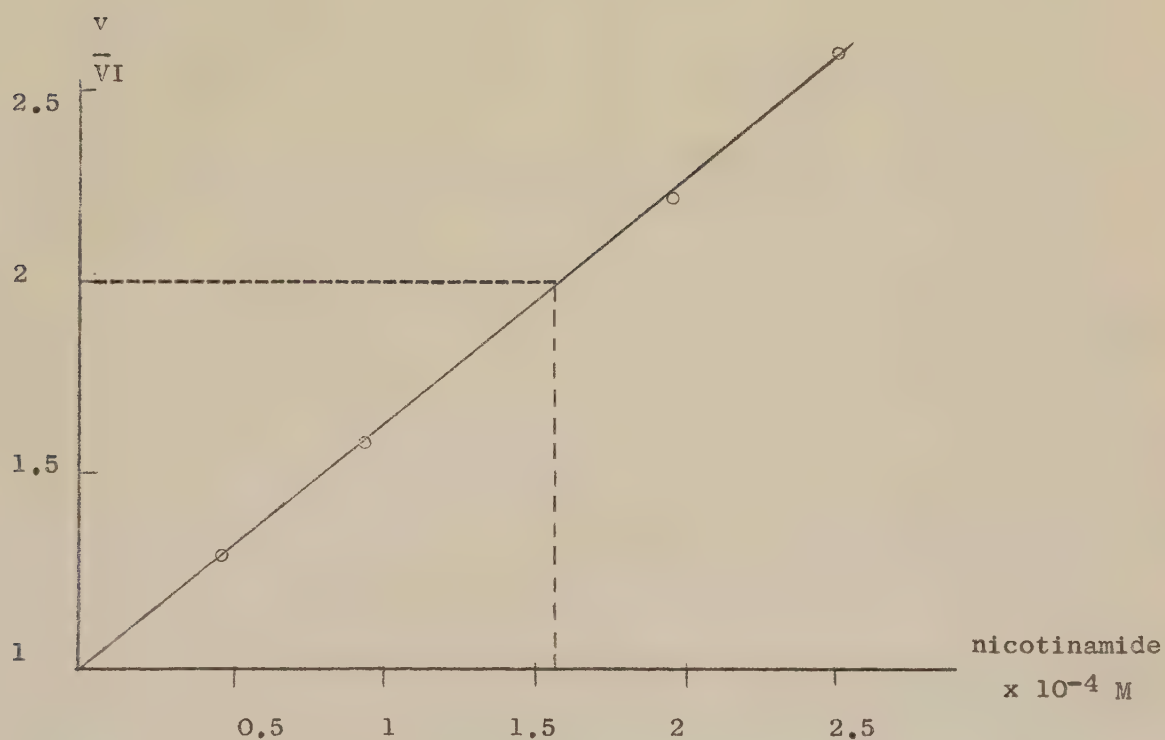


Figure 13

Influence de la concentration en nicotinamide
en présence de TPN 2.9×10^{-4} M



v , quantité de TPN hydrolysé en l'absence de nicotinamide

v_i , quantité de TPN hydrolysé en présence de nicotinamide

Après 30 min d'incubation à 37°, les dosages du TPN ont été effectués par la méthode enzymatique et ceux de l'analogue suivant ZATMAN et coll. (1954 b). L'ensemble des résultats montre que la TPN-ase n'est pas inhibée, au contraire, l'INH augmente son activité.

Substrat	Δ TPN mmoles	analogue formé mmoles
TPN	92	-
TPN + INH	152	40

Résumé

- 1°) Les foies de Pigeon, de Rat, de Mouton, contiennent une triphosphopyridine-nucléotidase spécifique, différente de la diphosphopyridine-nucléotidase.
- 2°) Dans les extraits bruts de poudre acétonique de foie de Pigeon et de Rat, l'hydrocortisone, la cortisone et la désoxycorticostérone inhibent l'hydrolyse du TPN mais pas l'hydrolyse du DPN.
- 3°) Il est possible de séparer les deux enzymes par la dialyse qui inactive la TPN-ase, l'action de la chaleur qui inactive la DPN-ase et par adsorption sélective sur le gel de calcium, qui retient l'activateur de la TPN-ase.
- 4°) La TPN-ase exige la présence d'un cofacteur, dialysable, thermostable. Ce cofacteur, anionique, se trouve dans les différents foies d'animaux essayés.
- 5°) La purification partielle de la TPN-ase de foie de Pigeon est décrite. Les principales propriétés physico-chimiques ont été déterminées; cette TPN-ase est très sensible aux ions minéraux et n'a pas d'activité transglycosidasique en présence d'INH.
- 6°) La TPN-ase de foie de Rat est caractérisée par sa sensibilité à la concentration en substrat (autoinhibition), à la nicotinamide : elle a une activité transglycosidasique en présence d'INH.

Chapitre IV

PROBLEMES DE SOLUBILISATION ET RECHERCHE

D'UNE AUTRE SOURCE D'ENZYME

Les difficultés rencontrées au cours de la purification de la TPN-ase du foie, aussi bien que l'instabilité de l'enzyme conduisaient à rechercher une autre source d'enzyme. Or, les premières pyridine-nucléotidases caractérisées et étudiées, celles du cerveau (MANN et QUASTEL, 1941; Mc ILWAIN et RODNIGHT, 1949 a et b), se sont révélées très fortement liées aux fractions cellulaires insolubles.

Les travaux ultérieurs, concernant les PN-ases d'autres tissus, ont confirmé et étendu cette conclusion.

Diverses techniques ont été mises en oeuvre pour solubiliser ces enzymes. Le traitement du stroma des érythrocytes de Lapin par le n-butanol, selon la méthode de MORTON (1950), libère 0.2 p. 100 de l'enzyme (ALIVISATOS, KASHKET et DENSTEDT, 1956).

Un broyat de cerveau soumis à 15 min à l'oscillateur ultrasonique (RAYTHEON) donne une préparation homogène, colloïdale, non centrifugeable à 20 000 g, mais sans pour cela aboutir à la solubilisation de la DPN-ase. Une pseudo-solution a également été obtenue par Mc ILWAIN (1950) qui extrait l'enzyme du cerveau par du NaCl 1.2 M; la dilution, la dialyse font précipiter l'enzyme qui^{ne} peut être purifiée par les méthodes habituelles.

La rate de Boeuf, riche en DPN-ase, a été soumise à l'action répétée de la congélation et la décongélation, à celle du désoxycholate de sodium et de la digitonine sans aucun succès (ZATMAN, KAPLAN et COLOWICK, 1952).

Au moment où j'ai entrepris mes recherches, la meilleure solubilisation avait été réussie par ALIVISATOS et WOOLLEY (1956); 9 p. 100 de l'activité DPN-asiqne contenue à l'origine dans la rate de Boeuf se retrouve en solution après un traitement par l'alcool isoamylique, en présence d'acide désoxyribonucléique.

Cette difficulté de solubilisation est-elle le cas général ou bien est-il possible d'obtenir les pyridine-nucléotidases en solution à partir de tissus animaux, telle la PN-ase extraite et purifiée par NASON, KAPLAN et COLOWICK (1953), à partir du *Neurospora* cultivé dans un milieu déficient en zinc?

Après quelques essais préliminaires, compte tenu des indications fournies par les travaux de SPAULDING et GRAHAM (1947), qui ont mis en évidence la DPN-ase dans les organes suivants du Rat : cerveau, poumons, coeur, reins et muscles, j'ai fixé mon choix sur le foie et le liquide spermatique dans lequel j'ai trouvé une forte activité DPN-asiqne; enfin, des essais ont été effectués sur les érythrocytes.

Les animaux les plus variés ont été mis à contribution : Rat, Lapin, Pigeon, Mouton, Boeuf, Taureau. Nous avons également eu recours à du sang d'origine humaine.

Les pyridine-nucléotidases du foie de Rat et de Mouton.

A partir de la poudre acétonique des divers foies que j'ai utilisés, les enzymes sont solubilisées par simple extraction au moyen d'une solution de bicarbonate de potassium ou de Tris. Pour les préparations de foie de Rat et de Mouton, nous obtenons une bonne solubilisation des pyridine-nucléotidases, de l'ordre de 80 p. 100, à l'aide de deux extractions successives; c'est un résultat équivalent à celui donné par les mêmes opérations sur le foie de Pigeon.

Chaque extraction est opérée sur 250 mg de poudre de foie et 5 ml de tampon Tris; l'activité est mesurée sur une fraction de l'homogénat total; par centrifugation on obtient le premier surnageant; une nouvelle homogénéisation dans le même volume de tampon, suivie d'une centrifugation, fournit le deuxième surnageant.

Dans chacune des fractions, on détermine les activités DPN-asi-que et TPN-asi-que. Les résultats sont rassemblés dans le tableau suivant.

Tableau XI

Solubilisation des activités
pyridine-nucléotidasiques du foie

Fraction utilisée	Rat		Mouton	
	DPN μmoles	TPN μmoles	DPN μmoles	TPN μmoles
Homogénat total	667	223	266	236
1er surnageant	480	163	151	149
2me surnageant	96	58	44	40
Pourcentage total de l'activité solu- bilisée	36	78	73	80
Rapport $\frac{\text{DPN-ase}}{\text{TPN-ase}}$	2.35		1.1	

Conditions expérimentales :

La poudre acétonique de foie, 250 mg, est homogénéisée dans 5 ml de tampon Tris 0.05 M à pH 7.4; le 1er surnageant est obtenu par centrifugation de 20 min à 20 000 g. Le 2ème surnageant est obtenu par une nouvelle homogénéisation dans 5 ml de tampon, suivie d'une centrifugation.

Dans chaque tube à essai : Tris pH 7.5, 60 μmoles; DPN ou TPN 300 μmoles, 0.2 ml de la fraction étudiée. Volume final 1.2 ml.

Durée de l'incubation à 37° : 5 min pour l'activité DPN-asi-que de l'homogénat total du foie de Rat et le 1er surnageant; 30 min pour les activités du 2ème surnageant, 10 min pour les autres déterminations. Les résultats sont ramenés à une incubation de 30 min afin d'obtenir des valeurs comparables.

Dosage du DPN et du TPN par les méthodes enzymatiques

Valeurs exprimées en μmoles.

Nous pouvons voir que la solubilisation est indépendante de l'activité considérée; les faibles différences constatées ne proviennent que des conditions opératoires, en particulier de la durée de l'incubation. Seul le rapport de cette activité DPN-asi-que et TPN-asi-que varie dans d'assez larges mesures, suivant l'espèce dont provient le foie. Nous avons déjà vu que ces activités proviennent, dans le foie de Pigeon et de Rat, de l'existence de deux enzymes différenciées, une DPN-ase et une TPN-ase. L'expérience a confirmé qu'il en était de même dans le foie de Mouton.

L'activité des pyridine-nucléotidases dans les divers foies peut se mesurer par un rapport $\frac{\text{DPN-ase}}{\text{TPN-ase}}$; les valeurs obtenues sont pour le foie de Pigeon, 1.50 en moyenne, pour le foie de Rat, 2.30 à 2.50; pour le Mouton, 1 à 1.20. L'utilisation de la poudre de foie de Mouton, plus riche en TPN-ase, semblait donc tout indiquée; malheureusement, dès les premières études, j'ai constaté que les résultats étaient en tous points analogues à ceux obtenus avec la TPN-ase du foie de Pigeon.

Il n'y avait aucun intérêt à poursuivre les recherches dans cette direction.

Les pyridine-nucléotidases des érythrocytes.

J'avais mis en évidence la TPN-ase du foie de Pigeon et commencé son étude, lorsque HOFMANN (1957), puis HOFMANN et RAPOPORT (1957) publièrent une méthode de purification de la DPN-ase à partir des érythrocytes de Lapin. Ces auteurs traitent la poudre acétonique des stromas des érythrocytes de Lapin par l'alcool isoamylique; ils solubilisent ainsi une fraction des pyridine-nucléotidases, ce qui permet ensuite de les purifier par les méthodes classiques. Une dernière étape, l'adsorption sur gel de calcium permet de supprimer l'activité TPN-asi-que. Il y avait donc dans les érythrocytes, comme dans le foie, deux enzymes distinctes susceptibles d'hydrolyser le DPN d'une part et le TPN d'autre part. L'analogie s'étend même à la présence probable d'un cofacteur nécessaire à l'activité TPN-asi-que de l'enzyme des érythrocytes si l'on considère que, dans ce cas, comme pour l'enzyme

du foie, l'activité est supprimée après traitement au gel de calcium.

Intéressé par ces résultats, j'ai comparé les activités DPN-asique et TPN-asique des érythrocytes de différentes origines et étudié leur possibilité de solubilisation. (1)

Une série d'expériences, effectuées à l'aide de la poudre acétonique de stroma des érythrocytes, en suspension dans de l'eau, permet une première constatation : il y a une très grande variation d'activité enzymatique suivant l'origine du stroma (Tableau XII).

Ainsi, l'activité DPN-asique du sang de Lapin est 30 fois supérieure à celle du sang humain et plus de deux fois supérieure à celle du sang de Boeuf, mais l'activité TPN-asique du sang de Lapin n'est que les deux tiers de celle du sang de Boeuf.

Ces importantes variations individuelles sont une présomption favorable à l'hypothèse concernant l'existence de deux pyridine-nucléotidases spécifiques dans tous les stroma d'érythrocytes, comme dans celui des érythrocytes de Lapin. L'extraction et la solubilisation partielle des enzymes devaient confirmer ce point de vue puisqu'elles modifient le rapport des activités $\frac{\text{DPN-asique}}{\text{TPN-asique}}$ dans de notables proportions. Les pyridine-nucléotidases du stroma étant partiellement solubilisées par une solution 0.1 M en bicarbonate de K (HOFMANN, communication personnelle), j'ai homogénéisé 150 mg de stroma acétonique dans 5 ml de solution de bicarbonate; le surnageant de centrifugation est ensuite utilisé.

Dans le tableau XIII, je ne reporte que les résultats obtenus avec le stroma de sang de Boeuf et de Lapin, les plus riches en pyridine-nucléotidases d'après les premières expériences (Tableau XII). Nous pouvons constater que l'extraction des pyridine-nucléotidases n'est

(1) Je remercie M. le Professeur RAPOPORT d'avoir bien voulu m'inviter à l'Institut de Physiologie Chimique de l'Université Humbolt à Berlin. Les études qui suivent ont été faites dans le service du Dr E.C.G. HOFMANN.

Tableau XII

Activités DPN-asiqne et TPN-asiqne
liées au stroma des érythrocytes

Origine de l'enzyme	Activité DPN-asiqne	Activité TPN-asiqne	$\frac{\text{Act. DPN-asiqne}}{\text{Act. TPN-asiqne}}$
(Lapin	100	10.5	9.5
Sang de (Boeuf	46.5	16.3	2.8
(Porc	30.3	7.5	4
Sang humain	3.2	0.95	3.3

Conditions expérimentales

Pour chaque essai :

DPN ou TPN, 0.3 μ mole, Tris pH 7.5, 60 μ moles.

Suspension de stroma dans de l'eau bidistillée, 2 mg;

Volume final, 1.2 ml. Incubation à 37°

Les durées d'incubation varient de 15 min pour la mesure de l'activité DPN-ase du stroma de Lapin; pour l'activité du stroma humain, elle peut atteindre 180 min. (Nous avons dans ce dernier cas utilisé 4 mg de stroma pour les incubations).

Dosage par les méthodes enzymatiques.

Tous les résultats, recalculés en activité par mg de stroma et par heure, sont exprimés en p. 100 de l'activité DPN-ase du stroma des érythrocytes de Lapin.

Un mg de poudre acétonique de stroma de Lapin hydrolyse au cours de cette expérience 0.6 μ mole. de DPN en 60 min.

Tableau XIII

Solubilisation des activités DPN-asiqque et
TPN-asiqque du stroma des érythrocytes

Origine du stroma	Activités solubilisées en présence de bicarbonate de potassium en p.100 de l'activité liée au stroma de Lapin			Activités présentes dans le stroma
	DPN - asiqque	TPN - asiqque	$\frac{\text{DPN-asiqque}}{\text{TPN-asiqque}}$	$\frac{\text{DPN-asiqque}}{\text{TPN-asiqque}}$
Lapin	35.6	0.8	44.5	9.5
Bœuf	12.7	2.1	6.05	2.3

Conditions expérimentales

Ce sont celles du tableau précédent : la suspension de stroma étant remplacée par l'extrait enzymatique obtenu en homogénéisant 150 mg de stroma acétonique dans 5 ml de solution de bicarbonate de potassium 0.10 M; après centrifugation de 20 min à 20 000 g, on utilise pour la mesure de l'activité DPN-ase 0.2 ml de surnageant, correspondant à 6 mg de stroma, durée de l'incubation 180 min. Les résultats, ramenés au mg de stroma d'origine, sont exprimés en p. 100 de l'activité DPN-asiqque liée au stroma des érythrocytes de Lapin.

que partielle; on retrouve tout de même 35.6 p. 100 de l'activité DPN-asiqne des érythrocytes de Lapin et 27.3 p. 100 de celle présente dans le stroma des érythrocytes de Boeuf. Une autre conclusion concerne l'activité TPN-asiqne; elle est beaucoup moins soluble que l'activité DPN-asiqne. Après solubilisation, le rapport des activités $\frac{\text{DPN-asiqne}}{\text{TPN-asiqne}}$ passe de 9.5 à 44.5 pour le stroma de Lapin et de 2.8 à 6.05 pour celui de Boeuf.

Les activités de la DPN-ase et de la TPN-ase dans le stroma de Boeuf sont vraisemblablement distinctes, comme dans le cas du sang de Lapin. Il est possible de le vérifier en opérant comme je l'ai fait dans le cas du foie de Pigeon (Cf. p.45) : l'extrait enzymatique est mis en présence de deux substrats DPN et TPN; s'il s'agit d'une seule enzyme, il y aura compétition entre les substrats; s'il s'agit de deux enzymes, chacun des substrats sera hydrolysé proportionnellement à l'activité de chacune des enzymes. Ce raisonnement n'est valable que dans la mesure où la plus grande quantité de pyridine-nucléotides hydrolysés au total ne provient pas d'un accroissement de la concentration totale en substrat. J'ai vérifié ce fait et les résultats rassemblés dans le tableau XIV montrent que les deux activités sont différentes; aux concentrations utilisées, la DPN-ase est sans action sur le TPN et la TPN-ase est sans action sur le DPN; nous pouvons également ajouter que dans un mélange des deux substrats en présence de deux activités enzymatiques, il n'y a pas d'inhibition réciproque.

Il est donc possible d'utiliser le sang de Boeuf comme source de TPN-ase; ce matériel présente l'avantage d'être à la fois facilement accessible, abondant et plus riche en enzyme que les autres sangs employés.

Tableau XIV

Activités DPN-asique et TPN-asique
en présence de deux substrats

Substrat μmoles	DPN hydrolysé μmoles	TPN hydrolysé μmoles
DPN 300	115	
DPN 600	116	
TPN 300		41
TPN 600		40
DPN 300 + TPN 300	116	39

Conditions expérimentales

Dans chaque essai, en plus des quantités de pyridine-nucléotides, indiquées dans le tableau, les tubes contiennent :

Tris pH 7.5 μmoles; suspension de stroma de sang de Boeuf dans de l'eau distillée, 2 mg, volume final 1.2 ml, incubation de 30 min à 37°.

Doisages par les méthodes enzymatiques

Les pyridine-nucléotidases du sperme de Taureau.

La solubilisation de cette pyridine-nucléotidase ne pose aucun problème puisque les enzymes se trouvent secrétées sous forme soluble. C'est d'ailleurs avec l'espoir de tourner les difficultés de solubilisation que j'ai entrepris sur ce matériel des essais qui se sont révélés intéressants. Les pyridine-nucléotidases ne sont pas liées aux spermatozoïdes; elles se retrouvent totalement dans le surnageant de centrifugation à 20 000 g du liquide spermatique. Les résultats des essais effectués sur le liquide spermatique et les deux fractions de centrifugation, spermatozoïdes et plasma séminal, sont rassemblés dans le tableau XV.

La faible activité enzymatique de la suspension de spermatozoïdes n'est vraisemblablement que celle représentée par le liquide séminal fixé sur le culot de centrifugation.

Enfin, l'activité TPN-asiq est supérieure à l'activité DPN-asiq. Comme toutes les pyridine-nucléotidases non spécifiques étudiées jusqu'à ce jour hydrolysent le DPN plus rapidement que le TPN, j'espérais avoir trouvé la possibilité d'extraire une TPN-ase particulièrement active. Malheureusement une expérience effectuée en présence d'un mélange des deux substrats devait mettre en évidence une compétition entre les substrats et montrer qu'il s'agissait d'une seule enzyme non spécifique, une pyridine-nucléotidase plus active en apparence sur la TPN-ase que sur le DPN. L'explication de ce dernier fait devait venir de la purification et de l'étude des propriétés physico-chimiques de la pyridine-nucléotidase du sperme, sujet du chapitre suivant.

Tableau XV

Répartition des activités pyridine-nucléotidasiques
dans le sperme de Taureau

Fraction utilisée	DPN hydrolysé	TPN hydrolysé
Sperme total	100	105
Plasma séminal	95	95
Spermatozoïdes	12	8

Conditions expérimentales :

Tris pH 7.5, 50 μ moles, DPN et TPN 0.5 μ mole

Liquide spermatique de Taureau en quantité suffisante pour hydrolyser 50 p. 100 du DPN en 6 min d'incubation à 37°; même quantité de plasma séminal et de suspension de spermatozoïdes ramenés au volume d'origine par addition d'une solution à 9 p. 1000 de ClNa.

Volume final : 1 ml

Arrêt de l'expérience par addition de 2 ml de solution de CNK 1.5 M.

Les résultats sont exprimés en p. 100 de l'activité DPN-
asique du sperme total.

Résumé

J'ai étudié dans divers tissus, la possibilité d'extraire une TPN-ase soluble, suffisamment active et stable pour pouvoir être purifiée ultérieurement. Les travaux présents se groupent en trois points :

- 1°) Dans le foie de Mouton, la TPN-ase est relativement plus abondante que dans le foie des autres animaux étudiés. Cette TPN-ase ne se différencie guère de celle du foie de Pigeon.

- 2°) Les érythrocytes du sang de Bœuf ont une TPN-ase plus active que celle des érythrocytes de l'Homme, du Lapin et du Porc. L'utilisation des techniques mises au point par d'autres auteurs pour le sang de Lapin devrait permettre la purification de cette TPN-ase, en quantité suffisante pour en faire l'étude.

- 3°) Le sperme de Taureau possède une pyridine-nucléotidase particulièrement active et en solution dans le plasma séminal.

Chapitre V

ETUDE DE

L'ACTIVITE PYRIDINE-NUCLEOTIDASIQUE DU SPERME.

Parmi les nombreux tissus examinés par ZATMAN et coll. (1954), figure la prostate d'origine humaine. Puisque la phosphatase prostatique se retrouve dans le sperme, j'espérai; par analogie, y retrouver les pyridine-nucléotidasessous forme soluble. Effectivement, les premiers essais ont montré une importante concentration de l'enzyme dans le liquide spermatique. Nous savons aujourd'hui (LEONE et BONADUCE, 1959) qu'une partie, sinon la totalité, en est également secrétée par les vésicules séminales.

Le premier objectif était de préparer une TPN-ase spécifique. Nous verrons que cela n'est pas possible : il s'agit, pour l'enzyme spermatique, d'une pyridine-nucléotidase non spécifique qui hydrolyse à la fois le DPN et le TPN. Ses propriétés rappellent par plus d'un point les enzymes du foie, du cerveau, des érythrocytes ou de la rate. Comme pour les autres PN-ases il n'a pas été possible non plus de mettre en évidence le rôle du cofacteur pour l'hydrolyse du TPN. Néanmoins, l'importante activité et la concentration de la PN-ase dans le sperme incitaient à poursuivre le travail de purification, d'autant plus que l'activité spécifique des enzymes d'origine animale étudiées jusqu'à ce jour est relativement faible.

LEONE et BONADUCE ont signalé la présence de pyridine-nucléotidase dans la sécrétion des vésicules séminales des Tauteaux. Ces pyridine-nucléotidasés, selon la conclusion des auteurs, semblaient pouvoir être scindées en deux enzymes spécifiques. Cette dernière remarque était particulièrement intéressante. Les auteurs de la note donnaient les résultats suivants (recalculés d'après les activités

totales de chaque fraction :

	$\frac{\text{TPN-ase}}{\text{DPN-ase}}$
- Sécrétion vésiculaire	1.39
- Extrait acétique	1.01
- Fraction précipitée à 55 p. 100	
de saturation par $\text{SO}_4 (\text{NH}_4)_2$	0.91
- Fraction précipitée entre 40 et 50 p. 100	
d'acétone	1.05
- Surnageant au traitement par le gel de calcium ..	0.70
- Eluat de gel de calcium	1.08

Suivant la fraction essayée, le rapport des activités enzymatiques varie de 0.7 à 1.39. On pouvait donc espérer séparer les deux enzymes par des techniques appropriées.

En fait, il ne s'agit que d'un artefact expérimental. Aucune technique n'a permis cette séparation; au contraire, tous les renseignements obtenus tendent à démontrer l'identité des PN-ases du sperme et des vésicules séminales qui en seraient ainsi le lieu de production.

Avant de décrire la méthode de purification et l'étude des propriétés de la PN-ase du sperme, je présenterai quelques uns des essais effectués dans le but d'isoler une TPN-ase spécifique et qui expliquent les résultats apparents obtenus à l'aide de l'enzyme des vésicules séminales.

A Essais de ségrégation des pyridine-nucléotidases des vésicules séminales

Préparation de l'extrait utilisé:

Les vésicules séminales de Taureaux ont été prélevées à l'abattoir, puis congelées à $- 20^\circ$ jusqu'au moment de l'utilisation. Les vésicules séminales sont alors broyées au moulin à hacher la viande (la température est maintenue entre 0 et 2° au cours des opérations). La pulpe est mise en suspension dans 10 fois son volume d'acétone à $- 15^\circ$

et homogénéisée 1 min en vérifiant que la température du mélange remonte à -2° . La suspension est filtrée sur buchner; la pâte qui reste sur le papier filtre est lavée dans 5 fois son volume d'acétone à -5° , puis, à nouveau, sur buchner. Cette dernière opération est renouvelée, et le résidu final est desséché sous vide et pulvérisé. La poudre beige claire obtenue, conservée plus d'un an au réfrigérateur à $+3^{\circ}$, en atmosphère sèche, a encore toute son activité.

Pour les expériences, 1 g de poudre acétonique est homogénéisée dans 20 ml de tampon Tris-maléique 0.02 M pH 7.5. Une centrifugation de 20 min à 20 000 g donne un surnageant qui contient les pyridine-nucléotidases.

Sélection apparente des activités sous l'action de la température

L'extrait de poudre acétonique est partagé en quatre fractions; l'une d'entre elles est conservée comme témoin, les trois autres sont respectivement portées à 55, 60 et 65° pendant 10 min selon la technique déjà décrite, puis refroidie à 0° . Les activités des surnageants de centrifugation sont mesurées dans les conditions de durée d'incubation qui sont celles utilisées par LEONE et BONADUCE. Les résultats rapportés dans le tableau XVI montrent une ségrégation apparente des activités enzymatiques; il ne semble pourtant pas que l'une des deux enzymes soit particulièrement plus thermolabile que l'autre, comme dans le cas des enzymes du foie et des érythrocytes, où les TPN-ases sont plus thermostables que les DPN-ases. La différence entre les vitesses d'inactivation est trop faible pour être significative.

Tableau XVI

Variation apparente des activités pyridine-nucléotidasiques
à la suite d'une inactivation thermique partielle

Fraction	Δ TPN $\times 10^3$	Δ DPN $\times 10^3$	$\frac{\Delta \text{TPN}}{\Delta \text{DPN}}$
Enzyme brute	165	166	1
55°	142	163	0.37
60°	52	41	1.27
65°	17	23	0.74

Conditions expérimentales

DPN ou TPN, 250 μ moles; tampon Tris-maléique pH 7.5,
0.05 M, enzyme 5 μ l. volume final 1 ml. Durée de l'incubation
8 min à 37°.

Incubations arrêtées et mesurées par la méthode au cyanure

Les valeurs portées dans le tableau représentent la dimi-
nution de la densité optique de chaque expérience, densité mesurée
à 325 μ , avant et après incubation.

Mesure de l'activité en fonction de la durée de l'incubation

En vue de la purification, j'ai voulu déterminer les meilleures conditions de mesure de l'activité; j'ai tout d'abord mesuré l'activité DPN-ase et TPN-ase en fonction du temps.

Pour obtenir le maximum de précision, l'hydrolyse des pyridine-nucléotides a été suivie par électrométrie. L'hydrolyse du DPN- (et du TPN) libère un équivalent d'ion hydrogène suivant l'équation suivante :



L'acidité est neutralisée au fur et à mesure de sa libération par addition de soude décinormale au moyen d'une microburette.(1)

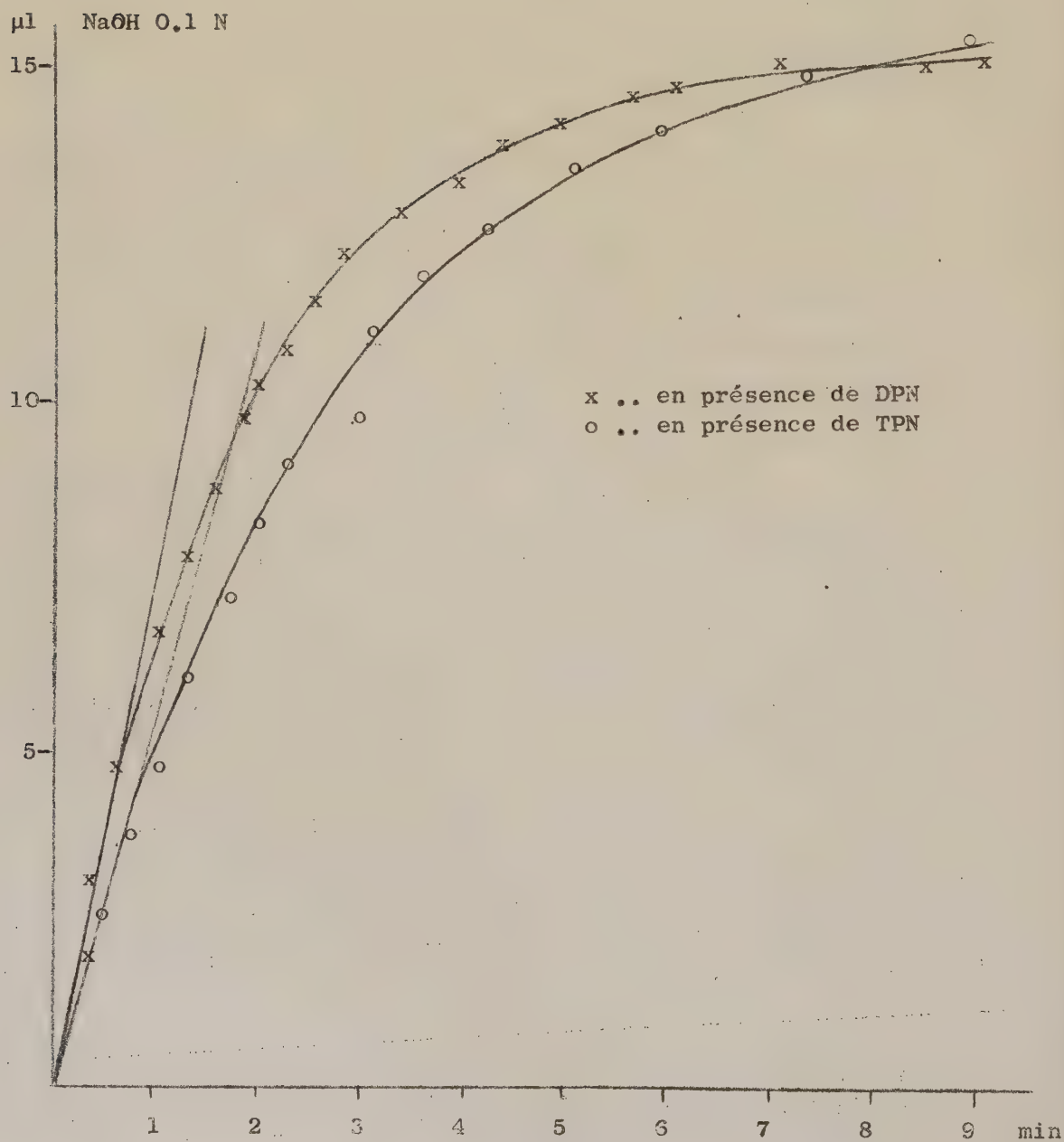
Les incubations ont été effectuées à 37°, en présence de 2.5 µmoles de DPN ou de TPN et 180 µg de protéine enzymatique dans 10 ml de ClNa 0.1 N. L'enzyme est obtenue par précipitation à 55 p. 100 de saturation sulfate d'ammonium; cette fraction donne, d'après les auteurs précités un rapport $\frac{\text{TPN-ase}}{\text{DPN-ase}} = 1.05$.

Les résultats que j'ai obtenus sont représentés sur la Fig. 14; ils sont éloquentes; l'activité de la DPN-ase et celle de la TPN-ase varient en fonction du temps, mais les variations ne sont pas parallèles. On ne peut donc pas tenir compte du seul rapport des activités; ce dernier dépend directement de la durée de l'incubation pour une activité donnée de la préparation enzymatique. Si l'on calcule les activités spécifiques de l'enzyme, elles varient dans des proportions de 1 à 4, suivant qu'elles sont établies après 30 secondes d'incubation ou après 8 min, comme le font LEONE et BONADUCE. Comment, dans ce cas, interpréter simplement les variations pour en déduire qu'il existe ou non deux pyridine-nucléotidases différentes? Il faudrait au moins connaître les vitesses d'hydrolyse initiales en présence d'un excès de substrat.

(1) Je remercie Mademoiselle J. YON pour la patience avec laquelle elle m'a initié à l'utilisation de l'appareillage nécessaire

Figure 14

Hydrolyse enzymatique du DPN et du TPN
par la pyridine-nucléotidase des vésicules séminales
en fonction du temps



Courbe électrotitrétrique

D'après mes expériences, on serait plutôt en présence d'une pyridine-nucléotidase semblable à celle que l'on obtient à partir du cerveau : une diphosphopyridine-nucléotidase active également sur le TPN. Cependant cela n'explique pas un fait qui demeure : l'activité triphosphopyridine-nucléotidase, inférieure à l'activité diphosphopyridine-nucléotidase, au début de la courbe diminue moins rapidement pour, finalement, être supérieure à l'activité diphosphopyridine-nucléotidase après quelques minutes d'incubation; le rapport $\frac{\text{TPN-ase}}{\text{DPN-ase}}$ passe de 0.78 après 30 secondes à 1.01 après 8 min d'incubation. Les mesures effectuées sur l'enzyme de sperme purifié montreront que l'écart entre les constantes de Michaelis observées en présence de deux substrats rend compte de la plus grande activité TPN-ase aux faibles concentrations en substrat.

Compte tenu des conclusions fournies par cette expérience, il n'est plus possible de tirer argument des variations des rapports d'activité obtenus par les seules mesures d'hydrolyse des substrats pour conclure à l'existence de deux enzymes différentes. On ne peut comparer que les vitesses maximum d'hydrolyse en présence de chacun des deux substrats.

Activité en présence des deux substrats

Lorsque les pyridine-nucléotidasés du foie de Pigeon, de Rat ou des érythrocytes agissent sur un mélange de DPN et de TPN, il y a addition des activités, chacune des enzymes, TPN-ase et DPN-ase, hydrolyse son substrat. J'ai refait la même expérience avec l'extrait des vésicules séminales. Les conditions expérimentales tiennent compte des conclusions du travail précédent : l'incubation est de très courte durée, 1 min seulement, durée pour laquelle on peut encore considérer l'hydrolyse comme directement proportionnelle au temps. Les dosages des quantités de TPN et de DPN hydrolysés donnent des résultats identiques pour les deux méthodes, enzymatique et chimique. (Tableau XVII). Il s'agit donc bien d'une activité pyridine-nucléotidasique.

titres :

Tableau XVII

Activités pyridine-nucléotidasiques
des vésicules séminales en présence
des deux substrats

Substrat	Méthode enzymatique		au cyanure
	Δ DPN m μ moles	Δ TPN m μ moles	Δ Total
DPN 180	71		70
DPN 360	77		79
TPN 175		55	55
TPN 350		59	58
DPN 180 + TPN 175	39	37	78

Conditions expérimentales

Dans chaque essai, en plus des quantités de DPN et de TPN indiquées, les tubes contiennent :

tampon Tris-maléique pH 7.5, 0.05 M final; enzyme des vésicules séminales, 18 μ g de protéines.

Volume final, incubation 60 secondes à 37°.

Arrêt des expériences par l'acide trichloracétique pour les mesures effectuées par les méthodes enzymatiques ou par addition de cyanure pour la méthode chimique.

Les valeurs trouvées appellent d'autres commentaires :

1° - l'hydrolyse croît avec la concentration en substrat présent à l'origine,

2° - dans l'incubation en présence du mélange des deux substrats, il y a bien un accroissement de 10 p. 100 de la quantité totale de TPN et de DPN hydrolysé par rapport à la quantité de DPN hydrolysé lorsqu'il est seul en solution (78 μ moles au lieu de 70 μ moles), mais cet accroissement, significatif pour les méthodes de dosage utilisées, ne provient que d'un accroissement de la concentration totale en substrat. L'hydrolyse est la même en présence du seul DPN ou du mélange DPN-TPN à la même concentration (79 et 78 μ moles). Si nous nous étions trouvés en présence de deux enzymes distinctes il y aurait au moins 70 + 55 μ moles de pyridine-nucléotides hydrolysés. Avec les 78 μ moles trouvés au total par le dosage de cyanure, il est difficile d'admettre l'existence de deux enzymes séparées, au contraire, les résultats du dosage enzymatique montrent qu'il y a compétition entre les deux substrats pour une même enzyme.

Essai de ségrégation par digestion trypsique

La purification de la DPN-ase et de la TPN-ase selon LEONE et BONADUCE ne permet pas d'obtenir une modification du rapport des activités malgré la perte de plus de 95 p. 100 de l'activité d'origine; un autre essai de séparation des activités a été tenté au moyen de la digestion trypsique.

Un extrait brut de poudre acétonique de vésicules séminales est préparé avec un gramme de poudre homogénéisée dans 20 ml de Tris-maléique pH 7.5, 0.05 M.

2 ml de surnageant de centrifugation sont mis en incubation à 37°, en présence de 2.3 mg de trypsine cristallisée.

Après 20, 44 et 68 min d'incubation, l'activité enzymatique restante est mesurée, en présence des deux substrats; la trypsine n'est pas éliminée pour effectuer ces essais.

Les résultats groupés dans le Tableau XVIII montrent que même après la destruction de 62 p. 100 de l'activité d'origine, il

Tableau XVIII

Action de la trypsine sur les activités
pyridine-nucléotidasiques
des vésicules séminales

Fraction	Δ DPN mmoles	Δ TPN mmoles	$\frac{\Delta \text{TPN}}{\Delta \text{DPN}}$
Extrait brut	289	227	0.78
Après digestion			
20 min	156	122	0.78
44 min	128	96	0.75
65 min	101	77	0.77

Conditions expérimentales

Dans chaque essai, DPN ou TPN mmoles;
20 μ l d'extrait brut ou digéré; tampon Tris-maléique, pH 7.5, 0.05 M
Volume final 1 ml; incubation 1 min à 37°
Dosage au cyanure.

n'est pas possible de constater une variation significative du rapport des activités di- et triphosphopyridine-nucléotidasique.

Conclusion de l'étude de l'enzyme des vésicules séminales

J'ai essayé plusieurs méthodes différentes dans leur principe pour mettre en évidence une DPN-ase et une TPN-ase spécifiques dans les vésicules séminales de Taureaux. Les chocs thermiques, la digestion trypsique, la mesure des activités en présence des deux **substrats** donnent un résultat commun : le rapport $\frac{\text{TPN-ase}}{\text{DPN-ase}}$ est voisin de 0,75. Dans ces conditions, on ne peut considérer le rapport = 1, obtenu par LEONE et BONADUCE, que comme un artefact qui provient de la longue durée de l'incubation; s'il n'est tenu compte que des vitesses initiales d'hydrolyse à toutes les étapes de la purification, le rapport demeure constant dans les limites des erreurs expérimentales.

Il s'agit vraisemblablement d'une enzyme unique qui ne se différencie guère de celle retrouvée dans le sperme et le plasma séminal; les K_s pour les deux substrats, la zone optimum d'activité en fonction du pH, le rapport enfin de ces activités sont en effet les mêmes, que l'enzyme soit isolée du sperme ou des vésicules séminales.

B Recherche des meilleurs conditions de purification de la pyridine-nucléotidase du sperme.

Toutes les opérations : précipitation, centrifugation, adsorption sur gel de calcium, chromatographie, sont effectuées à froid, entre 0 et 2°.

Mesure de l'activité enzymatique au cours de la purification

Les essais sont effectués en présence de 350 μ moles de DPN ou de TPN dans un volume final de 1 ml; tampon Tris-maléique, 0,05 M pH 7.5. L'enzyme est utilisée en quantité suffisante pour hydrolyser environ le quart du substrat pendant 1 min d'incubation

à 37°. Ces conditions ne permettent pas la vitesse maximum d'hydrolyse (il faudrait trop de substrat), mais donnent des résultats reproductibles.

Les expériences sont arrêtées par addition de 2 ml de CNK 1.5 M. Une unité représente la quantité de protéines qui hydrolyse 100 μ moles de DPN ou de TPN en 60 min, l'activité spécifique étant le nombre d'unités par mg de protéine.

Fractionnement au sulfate d'ammonium.

Ces fractionnements sont opérés sur 20 ml de solution préparée en dissolvant 200 mg de poudre acétonique de liquide spermatique dans de l'eau distillée.

La solution enzymatique est amenée à 45 p. 100 de saturation en ajoutant le sulfate d'ammonium pulvérisé, par petites fractions et avec agitation. Après avoir ajouté 6.30 g de sulfate, l'agitation est poursuivie 20 min. Le précipité recueilli après 15 min de centrifugation à 20 000 g est mis en solution dans 14 ml d'eau.

Au surnageant de centrifugation on ajoute 2.8 g de sulfate d'ammonium dont la concentration finale est ainsi de 65 p. 100. Après agitation, puis centrifugation, le nouveau culot est dissous dans 4 ml d'eau.

Les deux fractions sont mises à dialyser 6 heures contre 2 l de tampon phosphate de potassium, 0.01 M, pH 7.0 renouvelé toutes les deux heures.

Les activités sont déterminées dans les conditions décrites les résultats sont rapportés dans le tableau XIX.

Les résultats d'un fractionnement différent, avec séparation de la fraction qui précipite à 40 p. 100, puis celle qui précipite entre 40 et 65 p. 100 de saturation, sont reportés dans le tableau XX.

En conclusion, de l'examen des deux tableaux XIX et XX, il ressort que, pour obtenir l'activité spécifique la plus élevée du moyen d'une seule précipitation au sulfate d'ammonium, il faut précipiter en-

tre 45 et 65 p. 100 de saturation, mais on ne récupère que 17 p. 100 de l'activité totale.

Quand on voudra poursuivre la purification par d'autres méthodes, il faudra utiliser la fraction qui précipite entre 40 et 65 p. 100 de saturation et concentre près de 60 p. 100 de l'activité totale

Tableau XIX

Exemples de purification de la pyridine-nucléotidase du sperme par fractionnement au sulfate d'ammonium

Fraction	Volume ml	Protéines totales mg	Unités totales	p. 100 de l'activité d'origine	Activité spécifique	Coefficient de purification
Solution brute	20	200	24 400	100	122	
Fraction 0-45	12.4	183	20 850	85	104	x 0.93
Fraction 45-65	4.5	7	4 235	17	605	x 4.95

Tableau XX

Fraction	Volume ml	Protéines totales mg	Unités totales	p. 100 de l'activité d'origine	Activité spécifique	Coefficient de purification
Solution brute	20	200	24 400	100	122	
Fraction 0-40	12.4	148	10 950	45	74	x 0.61
Fraction 40-65	6.4	42.5	14.120	58	333	x 2.73

Fractionnement au gel de calcium

Le gel de calcium utilisé, préparé selon KEILIN, contient 29.2 mg/ml de poids sec; la préparation datait de 16 mois au moment de l'utilisation.

J'ai comparé les résultats obtenus en traitant par le gel chacune des deux fractions obtenues par précipitation préalable au sulfate d'ammonium, entre 0 et 40 p. 100 de saturation et entre 40 et 65 p. 100. Les solutions d'enzyme sont dialysées avec agitation pendant 3 heures contre 1 l. de tampon phosphate 0.01 M, pH 6.4 renouvelé toutes les heures.

1er essai : 1 ml de la fraction 40-65 est dilué avec 4 ml d'eau distillée. Les 5 ml obtenus contiennent 6.6^{mg} de protéines; on ajoute 0.4 ml de gel de calcium, soit 2 mg de poids sec pour 1 mg de protéines. Après 15 min d'agitation la préparation est centrifugée 10 min à 20 000 g. Le surnageant, ou fraction S. Ca I, est à nouveau traité de la même façon par 0.4 ml de gel; le nouveau surnageant, ou fraction S. Ca II, après une addition de gel, fournira le surnageant S. Ca III.

On mesure l'activité totale et l'activité spécifique de chacune des fractions; les valeurs obtenues sont reportées dans le tableau XXI

Tableau XXI

Purification par le gel de calcium d'une préparation de forte activité spécifique au départ

Fraction	Activité spécifique	Activités relatives	Activité totale	Perte en activité p. 100
Solution 40-65	398	1	2 320	
S. Ca I	1 550	x 3.9	2 690	4.6
S. Ca II	2 070	x 5.2	2 720	4.
S. Ca III	1 720	x 4.3	2 020	23.5

2ème essai : Il est conduit de la même façon, avec la fraction 0-40 diluée 10 fois; elle contient alors 6 mg de protéines dans 5 ml.

Les résultats sont reportés dans le tableau suivant (XXII).

Tableau XXII

Purification par le gel de calcium d'une préparation de faible activité spécifique au départ

Fraction	Activité spécifique	Activités relatives	Activité totale	Perte en activité p. 100
Solution 0-40	173	1	438	
S. Ca I	350	x 4.8	430	2.
S. Ca II	512	x 7.	402	8.5
S. Ca III	527	x 7.2	300	31.5

Des résultats semblables sont régulièrement retrouvés pour les fractions d'une même origine.

L'activité spécifique maximum se retrouve toujours dans le surnageant de la deuxième adsorption par le gel de calcium (jusqu'à 3 255 pour une activité de 420 au départ), la perte d'activité nulle ou très faible, après la première adsorption, s'élève avec le nombre des adsorptions successives. Lors de la troisième adsorption il y a 80 à 100 fois plus de gel de Ca que de protéines, ce qui explique la diminution d'activité totale. Le culot de la troisième centrifugation, agité 10 min dans de l'eau distillée, libère à la première éluation la moitié de l'activité retenue.

Si la première adsorption des impuretés sur gel de calcium est faite avec des quantités de gel plus importantes, 10 mg de gel au lieu de 2 mg de protéines, il y a également une baisse de l'activité totale qui atteint 50 p. 100 de l'activité d'origine.

En conclusion, le traitement au gel de calcium est efficace, il y a intérêt à l'appliquer à des fractions déjà purifiées.

Fractionnement sur colonne de gel de calcium.

L'adsorption sélective des protéines étrangères sur le gel de calcium ayant donné d'excellents résultats, j'espérais améliorer la purification en utilisant non plus l'adsorption en masse mais la chromatographie sur colonne.

La colonne, de 6 mm de diamètre, est constituée par une burette de 5 ml, graduée en dixièmes de ml. Un tampon de fibre de verre est tassé dans le fond. On introduit 2.6 ml de gel de calcium lorsque le gel est déposé, le robinet est ouvert et l'excès de liquide s'écoule librement. La colonne est ensuite lavée avec 3 ml d'eau distillée. Quand on opère ainsi, la vitesse d'écoulement est très faible : 1.5 ml en deux heures.

Après le lavage de la colonne, on introduit 2 ml de la préparation enzymatique obtenue dans les mêmes conditions que celles utilisées pour le fractionnement par le gel de calcium. L'élution est réalisée avec du tampon phosphate 0.01 M; pH 6.4. Les fractions de 1 ml sont recueillies dans des tubes différents, puis essayées.

L'activité se trouve localisée dans deux fractions : celles qui sont recueillies dans les troisième et quatrième tubes (Tableau XXIII).

Tableau XXIII

Fractionnement sur colonne de gel de calcium

Fraction	Activité spécifique	Coefficient de purification	Activité totale	Perte en activité p. 100
Origine	420		7 260	
3ème tube	1 340	x 3.19	3 090	42.5
4ème tube	2 120	x 5.05	3 750	51.6
3ème + 4ème	1 720	x 4.1	6 840	94.1

Les résultats obtenus par adsorption des protéines inactives sur colonne de gel de calcium ne sont pas supérieures à ceux que l'on obtient plus simplement. Ils nous ont cependant encouragés à utiliser la technique chromatographique. J'ai substitué au gel de calcium une cellulose modifiée, la diéthylaminoéthylcellulose (DEAEC), dont les propriétés chimiques et physiques sont beaucoup plus régulières que celles du gel de calcium.

Fractionnement sur colonne de diéthylaminoéthyl-cellulose

Dans une colonne identique à celle utilisée pour le fractionnement par le gel de calcium, on introduit 2 ml de suspension de DEAEC, abondamment lavée à l'eau distillée (poids sec de la suspension : 20 mg/ml). Lorsque le dépôt est bien homogène, on introduit en plusieurs fois 12 ml de solution d'enzyme, fraction précipitée entre 40 et 60 p. 100 de saturation et dialysée à pH 6.4 puis du tampon phosphate, 0.01 M, pH 6.4. La vitesse d'écoulement est fixée à 2 gouttes par min. (2 ml en 18 à 20 min). Les fractions de 2 ml sont recueillies dans des tubes différents.

On détermine, pour chaque tube, la quantité de protéines et le nombre d'unités enzymatiques présentes. L'ensemble des résultats est groupé dans le tableau XXIV.

Tableau XXIV

Chromatographie sur colonne de DEAEC

Fraction	Activité spécifique	Unités par tube	Total des unités retrouvées	Protéines par tube mg	Total des protéines retrouvées
Origine	504	39 500		78.4	
Tube 1	580	267	267	0.46	0.46
Tube 2	3 240	3 310	3 577	1.02	1.48
Tube 3	1 135	8 850	12 427	7.78	9.26
Tube 4	1 050	10 070	22 497	10.24	19.50
Tube 5	885	7 350	29 847	8.3	27.8
Tube 6	471	5 900	35 747	12.5	40.3
Tube 7	502	2 500	38 247	4.08	44.38
Tube 8	0	0		2.03	46.41

En examinant le tableau XIV, on peut constater que l'essentiel de l'activité totale (76 p. 100) est recueillie dans les cinq premières fractions. L'activité spécifique la plus élevée est en relation avec les protéines les plus mobiles; la quasi totalité de l'activité de la préparation est récupérée dans les sept premières fractions.

L'ensemble des remarques effectuées au cours des divers fractionnements permet d'adopter le mode de purification suivant, qui donne une préparation active, reproductible, avec un excellent rendement.

C/ Purification de la pyridine-nucléotidase du liquide spermatique
1ère étape : Fractionnement au sulfate d'ammonium

800 mg de poudre acétonique de liquide spermatique sont mis en solution dans 60 ml d'eau distillée.

La solution est amenée à 40 p. 100 de saturation par addition de $0.28 \times 60 = 168$ g de sulfate d'ammonium pulvérisé.

Le sel est ajouté par petites fractions, sous agitation constante. L'agitation est ensuite maintenue pendant 20 min. Une centrifugation de 15 min à 20 000 g permet d'éliminer le précipité.

Le surnageant de centrifugation est porté à 65 p. 100 de saturation par addition de $0.175 \times 60 = 10.5$ g de sulfate d'ammonium, toujours par petites fractions pour éviter une sursaturation locale. Après 20 min d'agitation, la préparation est centrifugée 20 min à 20 000 g. Le culot de centrifugation, repris dans 11 ml d'eau distillée est dissout trois heures avec agitation contre 2 l de tampon phosphate de potassium 0.01 M pH 6.4 renouvelé toutes les heures.

2ème étape : Adsorption des protéines étrangères sur gel de calcium.

Après dialyse, la solution enzymatique contient 132 mg de protéines dans un vol. de 12 ml. Le pH est de 6.6.

La première adsorption est effectuée par addition de 4.5 ml de gel de calcium à 29.2 mg/ml (soit 131.4 mg de phosphate de Ca poids sec).

L'ensemble est agité 10 min, puis centrifugé 10 min à 20 000 g.

Le surnageant ou préparation S.Ca I contient 80.5 mg de protéines dans un vol. de 16 ml. La seconde adsorption est effectuée par addition de 4 ml de gel de calcium, soit 1.5 mg de phosphate de calcium, poids sec, par mg de protéines. Le mélange, d'abord agité 10 min est centrifugé 10 min à 20 000 g. On obtient ainsi la préparation S.Ca II qui contient la presque totalité de l'enzyme précipité entre 40 et 65 p. 100 de saturation au sulfate d'ammonium.

3ème étape : Chromatographie sur colonne de DEAE

La poudre de cellulose modifiée est lavée dans 50 fois son poids d'eau distillée. On laisse décanter, puis le surnageant est éliminé par siphonnage. Cette opération est renouvelée 5 fois. Finalement la poudre est conservée au réfrigérateur en suspension dans l'eau distillée. Au moment de l'utilisation, le surnageant est décanté une

nouvelle fois et remplacé par une quantité suffisante pour que 1 g de poudre soit en suspension dans 60 ml d'eau. La suspension homogénéisée par agitation est introduite dans une colonne constituée par une burette graduée de 13 mm de diamètre intérieur. Un tampon de laine de verre retient la poudre à la partie inférieure de la colonne. Après décantation, le robinet de la burette est ouvert pour assurer un écoulement de 2 gouttes à la minute, ce qui correspond, dans nos conditions, à 3 ml en 15 min. Quand le niveau de l'eau affleure le niveau de la poudre, un tampon de laine de verre est déposé sur la colonne de poudre qui mesure à ce moment : 14.5 cm de haut. La colonne est ensuite lavée avec 100 ml d'eau distillée puis on introduit le surnageant de la deuxième adsorption par le gel de calcium. Pendant les opérations, la vitesse d'écoulement est maintenue à 2 gouttes par minute.

Après adsorption de la solution d'enzyme, un volume égal d'eau distillée (20 ml) est ajouté, puis la colonne est "développée" par addition de phosphate de K 0.01 M pH 6.4. Les fractions de 5 ml sont recueillies dans des tubes séparés et leur adsorption à 260 et 280 m μ déterminée au spectrophotomètre.

Quand on a recueilli environ 50 ml, le rapport absorption à 280 m μ sur absorption à 260 m μ varie brusquement; il s'élève de 0.69 à 0.95 en même temps que la teneur en protéine passe de 90 μ g/ml à 225 μ g/ml (Tableau XXV). A partir de ce moment, l'enzyme sort de la colonne, l'élution est suivie par la mesure de l'activité contenue dans chaque fraction.

Dans trois préparations différentes, 50 p. 100 de l'enzyme chromatographié s'est retrouvée concentrée dans 20 ml; l'activité spécifique la plus élevée est toujours liée aux premières protéines actives, puis elle diminue régulièrement. La meilleure activité spécifique obtenue, mesurée à 37°, en présence de DPN, a été de 9 551.

Les résultats d'une des purifications sont rassemblés dans le Tableau XXVI. La meilleure activité spécifique, celle du tube 10, est 100 fois plus élevée qu'au départ.

Tableau XXV

Evolution du rapport $\frac{\text{absorption à } 280 \text{ m}\mu}{\text{absorption à } 260 \text{ m}\mu}$
et de la teneur en protéines, au cours de
l'élution

Tube	Rapport $\frac{280}{260}$	Protéines $\mu\text{g} / \text{ml}$
1	-	0
2	0.88	71
3	0.88	141
4	0.88	168
5	0.94	136
6	1.02	130
7	1.07	113
8	0.71	92
9	0.69	90
10	0.95	225
11	0.95	229
12	0.96	172
13	0.99	134

Tableau XXVI

Bilan d'une purification de la pyridine-nucléotidase
du sperme

Fraction	Volume ml	Protéines mg	Activité spécifique	Purific. ^{on} x	Activité totale	Rendement p. 100
Origine	60	600	81		48 600	
40.65	12	132	246	3	32 700	67
S. Ca I	16	80.5	514	6.3	31.500	65
S. Ca II	20	48.	840	10.5	30.200	62
Tube 10	5	1.125	8 120	100	9 140	19
Tube 11	5	1.145	6 550	81	7 500	15
Tube 12	5	0.860	4 550	56	3 920	8
Tube 13	5	0.670	3 540	44	2 370	5
Mélange des tubes 10 à 13	20	3 800	6 030	74	22 930	47

Conditions expérimentales :

DPN 300 μmoles, tampon Tris-maléique 0.05 M, pH 7.5.
Volume total 1 ml.

Enzyme en quantité suffisante pour hydrolyser 100 μmoles
environ en 1 min d'incubation à 37°

Dans ces conditions, l'enzyme n'est pas saturée en substrat;
les vitesses d'hydrolyse sont voisines de 90 p. 100 de la vitesse
maximum

D Propriétés de la pyridine-nucléotidase du sperme.

Stabilité de l'enzyme.

Des solutions contenant 180 à 230 µg de protéines par ml en solution dans du tampon phosphate 0.01 M, pH 6.4, ont pu être conservées 3 mois à 0° sans perdre d'activité; les mêmes solutions congelées à - 15°, pendant la même période, se sont également bien conservées.

La dialyse contre de l'eau distillée, prolongée 48h., provoque la précipitation de l'enzyme; après redissolution par addition de tampon, il n'y a aucune perte d'activité.

L'enzyme en solution à pH 6.5 dans du phosphate 0.01 M peut être incubée 48h. à 25° sans aucune diminution de l'activité; un chauffage de 5 min à 55° ne modifie pas cette activité.

Influence du pH sur l'activité.

L'enzyme est active dans une très large zone de pH, aussi bien en présence des tampons phosphate, acétate au Tris-maléique; cela pour la préparation brute, comme pour l'enzyme purifiée.

Le seul point remarquable est la constance de l'activité à partir de pH 7.3, jusqu'à au moins pH 10; l'activité s'étend même au-delà de pH 10, mais nous nous sommes limités à cette valeur car l'hydrolyse spontanée des pyridine-nucléotides (en particulier en présence de phosphate) interfère avec les mesures dans les solutions trop alcalines. Un essai effectué dans une solution pure de Tris 0.05 M (pH 10.15) semble indiquer que l'enzyme conserve toute son activité.

Les valeurs reportées sur la figure 15 ont été obtenues dans les conditions suivantes : TPN ou DPN, 200 mµmoles, enzyme 30 unités; tampon au pH indiqué préparé par mélange des solutions de Tris 0.5 M et d'acide maléique 0.5 M, 0.1 ml.

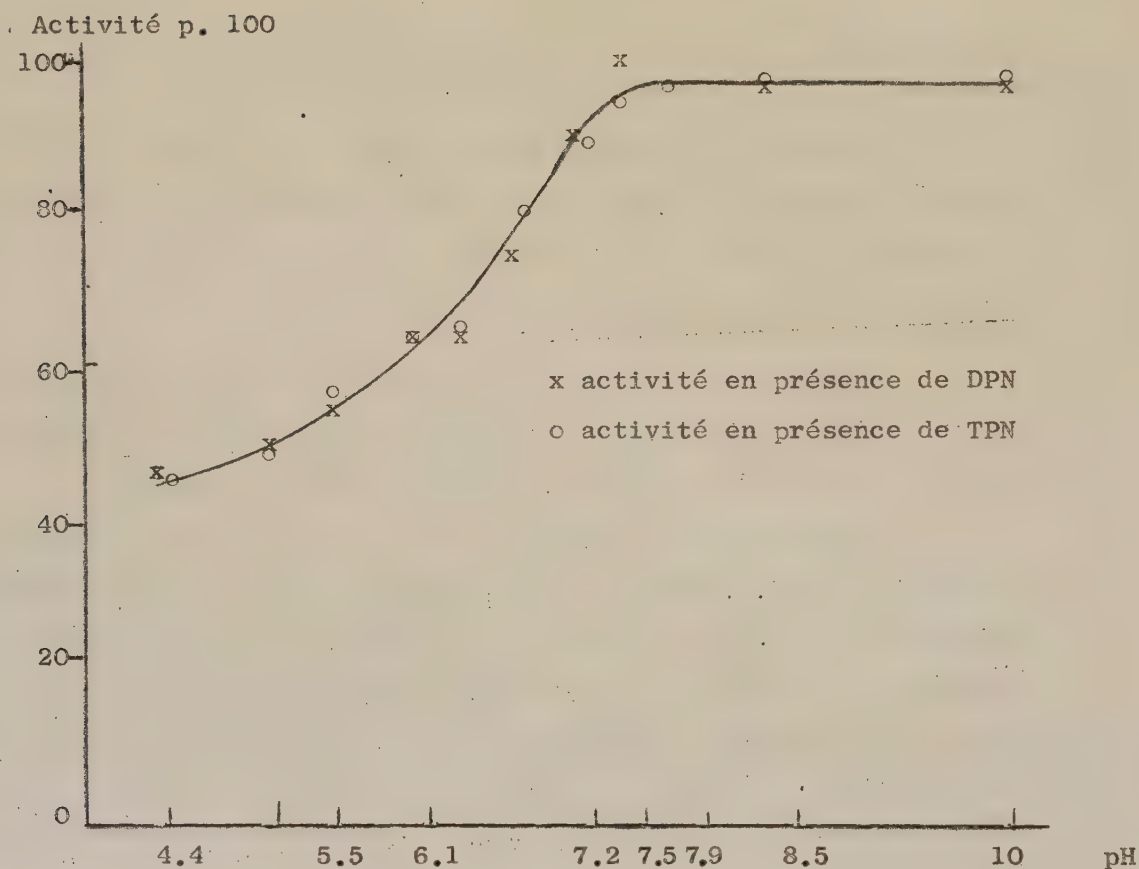
Volume final 1 ml; incubation de 1 min à 37°.

Nos préparations enzymatiques sont conservées à pH 6.5; bien que ce ne soit pas un pH d'activité optimum, nous avons remarqué la stabilité de l'enzyme dans ces conditions.

D

Figure 15

Courbe d'activité de la pyridine-nucléotidase du sperme



Conditions expérimentales :

DPN ou TPN, 200 μ moles par tube.

Enzyme purifiée 30 unités; tampon, 0.1 ml du mélange Tris 0.5 M + acide maléique 0.5 M.

Volume final 1 ml.

Incubation d'une minute à 37°. Dosages par le cyanure.

Activité en fonction de la concentration initiale du substrat

L'activité enzymatique dépend de la concentration en substrat; durant les premières⁶⁰ secondes d'incubation, la quantité de substrat hydrolysé est proportionnelle au temps et à la concentration en enzyme.

Pour déterminer la constante de Michaelis, nous avons utilisé cinq concentrations différentes en DPN ou TPN. Les résultats obtenus permettent de construire la courbe d'activité, en fonction de la concentration initiale en substrat. Nous avons employé le mode de représentation préconisé par LINEWEAKER et BURK (1934), l'inverse de la vitesse (quantité de substrat hydrolysé) est porté en ordonnée et l'inverse de la concentration en substrat à l'origine est porté en abscisse (Fig. 16 et 17).

Pour la simplification des calculs, on a, en fait, porté en abscisse l'inverse de la densité optique à l'origine mesurée à 325 mμ après addition du cyanure et en ordonnée l'inverse de la diminution de la densité optique, mesurée dans les mêmes conditions, mais rapportée à une minute d'hydrolyse.

Dans les conditions expérimentales suivantes : tampon Tris-maléique, 0.05 M, pH 7.5; 11,15 μg de protéines; 30 secondes d'incubation à 37°, on obtient :

pour le DPN, $K_s: 3.8 (\pm 0.2) 10^{-5}$ M et

pour le TPN, $K_s : 2 (\pm 0.2) 10^{-5}$ M

L'affinité de l'enzyme pour le TPN est 1.9 fois plus grande que pour le DPN.

Les vitesses maximum d'hydrolyse déterminée sur le graphique donnent une activité spécifique de 9 020 avec le DPN comme substrat et 6 900 avec le TPN; le rapport des activités

$$\frac{\text{TPN-ase}}{\text{DPN-ase}} \text{ est donc de } 0.76$$

Figure 16

Détermination de la constante de Michaelis
de la pyridine-nucléotidase du sperme
en présence de DPN

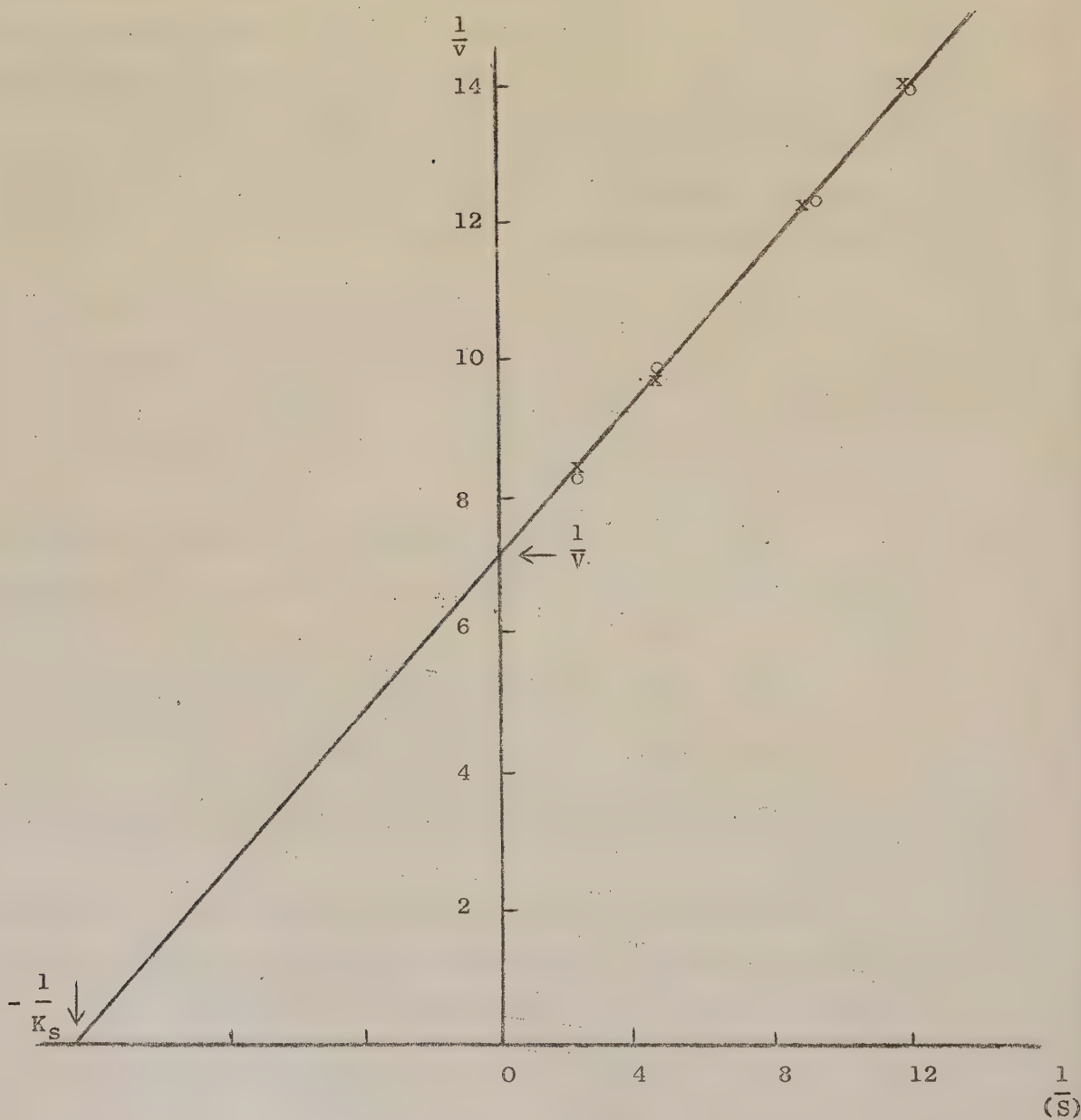
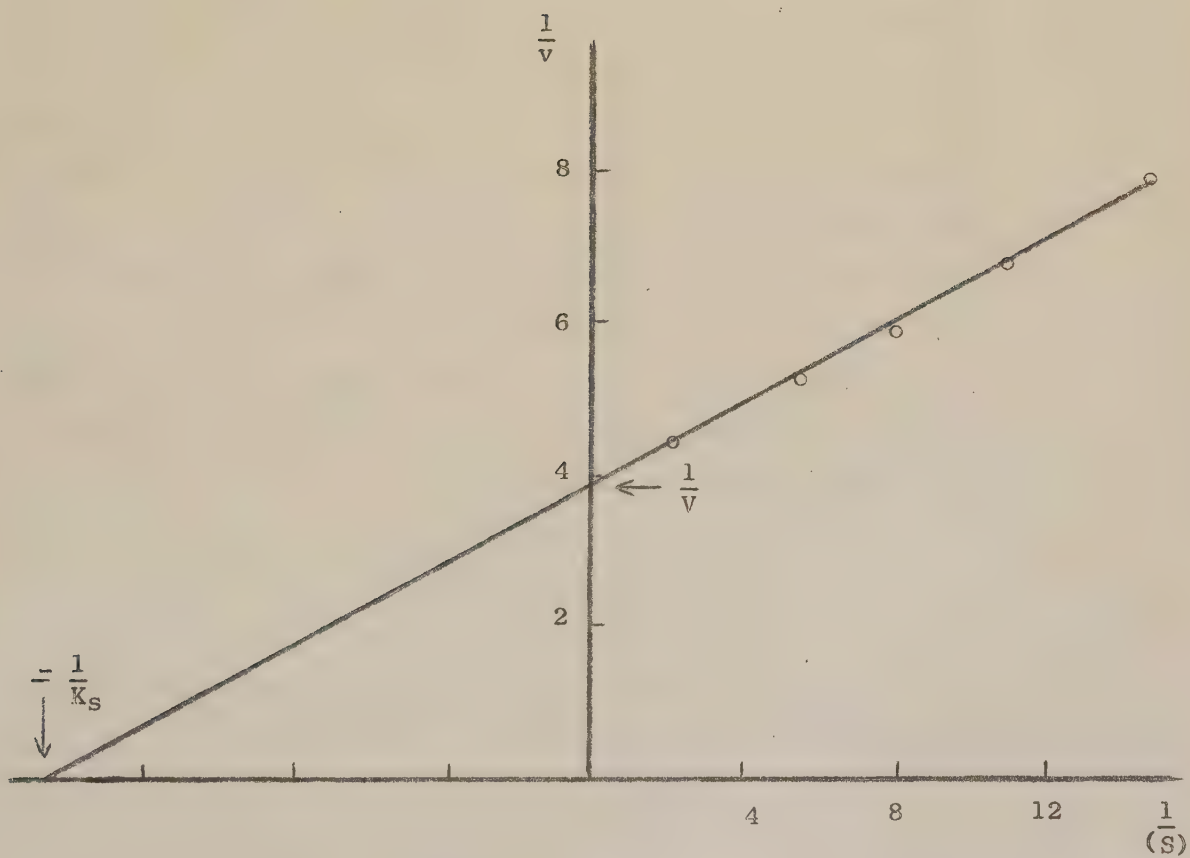


Figure 17

Détermination de la constante de Michaelis
de la pyridine-nucléotidase du sperme
en présence de TPN



Activité en fonction de la concentration initiale du substrat

L'activité enzymatique dépend de la concentration en substrat; durant les premières⁶⁰ secondes d'incubation, la quantité de substrat hydrolysé est proportionnelle au temps et à la concentration en enzyme.

Pour déterminer la constante de Michaelis, nous avons utilisé cinq concentrations différentes en DPN ou TPN. Les résultats obtenus permettent de construire la courbe d'activité, en fonction de la concentration initiale en substrat. Nous avons employé le mode de représentation préconisé par LINEWEAVER et BURK (1934), l'inverse de la vitesse (quantité de substrat hydrolysé) est porté en ordonnée et l'inverse de la concentration en substrat à l'origine est porté en abscisse (Fig. 16 et 17).

Pour la simplification des calculs, on a, en fait, porté en abscisse l'inverse de la densité optique à l'origine mesurée à 325 mμ après addition du cyanure et en ordonnée l'inverse de la diminution de la densité optique, mesurée dans les mêmes conditions, mais rapportée à une minute d'hydrolyse.

Dans les conditions expérimentales suivantes : tampon Tris-maléique, 0.05 M, pH 7.5; 11,15 μg de protéines; 30 secondes d'incubation à 37°, on obtient :

pour le DPN, $K_s: 3.8 (\pm 0.2) 10^{-5}$ M et

pour le TPN, $K_s : 2 (\pm 0.2) 10^{-5}$ M

L'affinité de l'enzyme pour le TPN est 1,9 fois plus grande que pour le DPN.

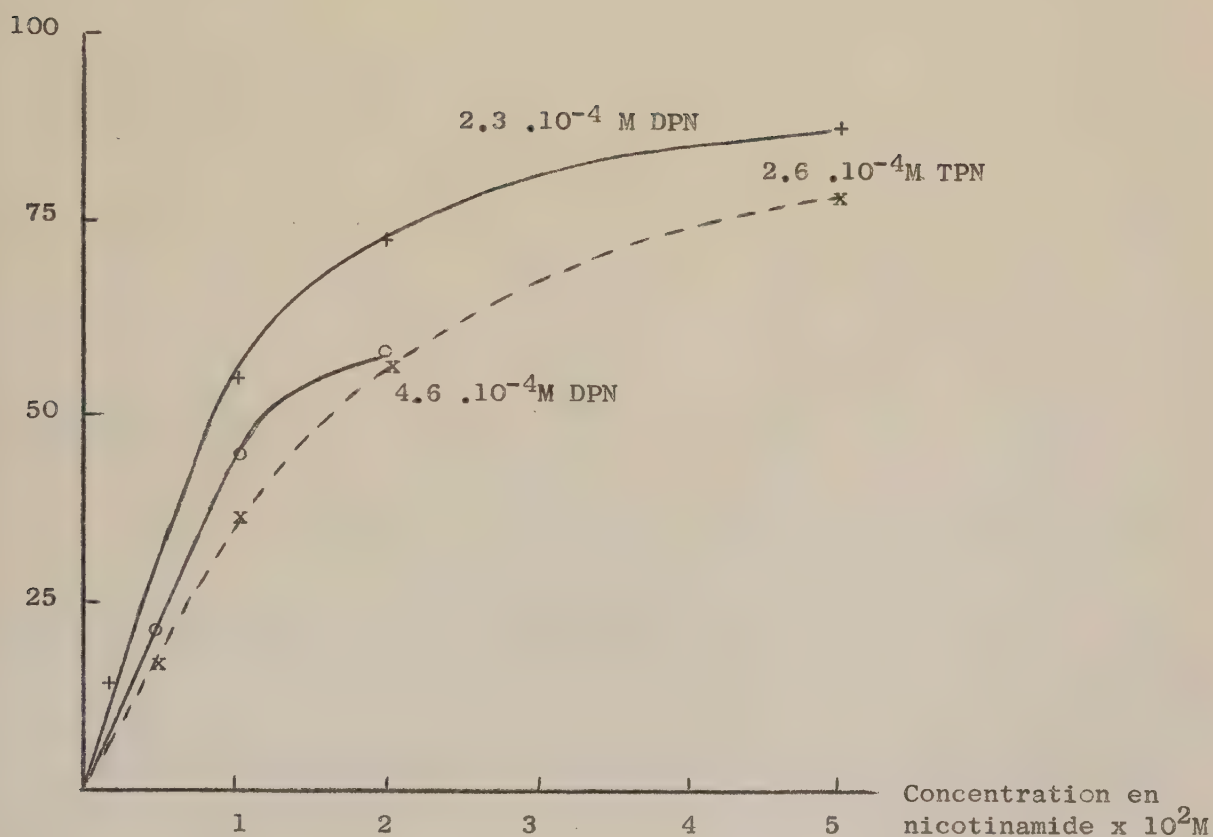
Les vitesses maximum d'hydrolyse déterminée sur le graphique donnent une activité spécifique de 9 020 avec le DPN comme substrat et 6 900 avec le TPN; le rapport des activités

$$\frac{\text{TPN-ase}}{\text{DPN-ase}} \text{ est donc de } 0,76$$

Figure 18

Inhibition de la pyridine-nucléotidase
par la nicotinamide

Inhibition p.100



Conditions expérimentales

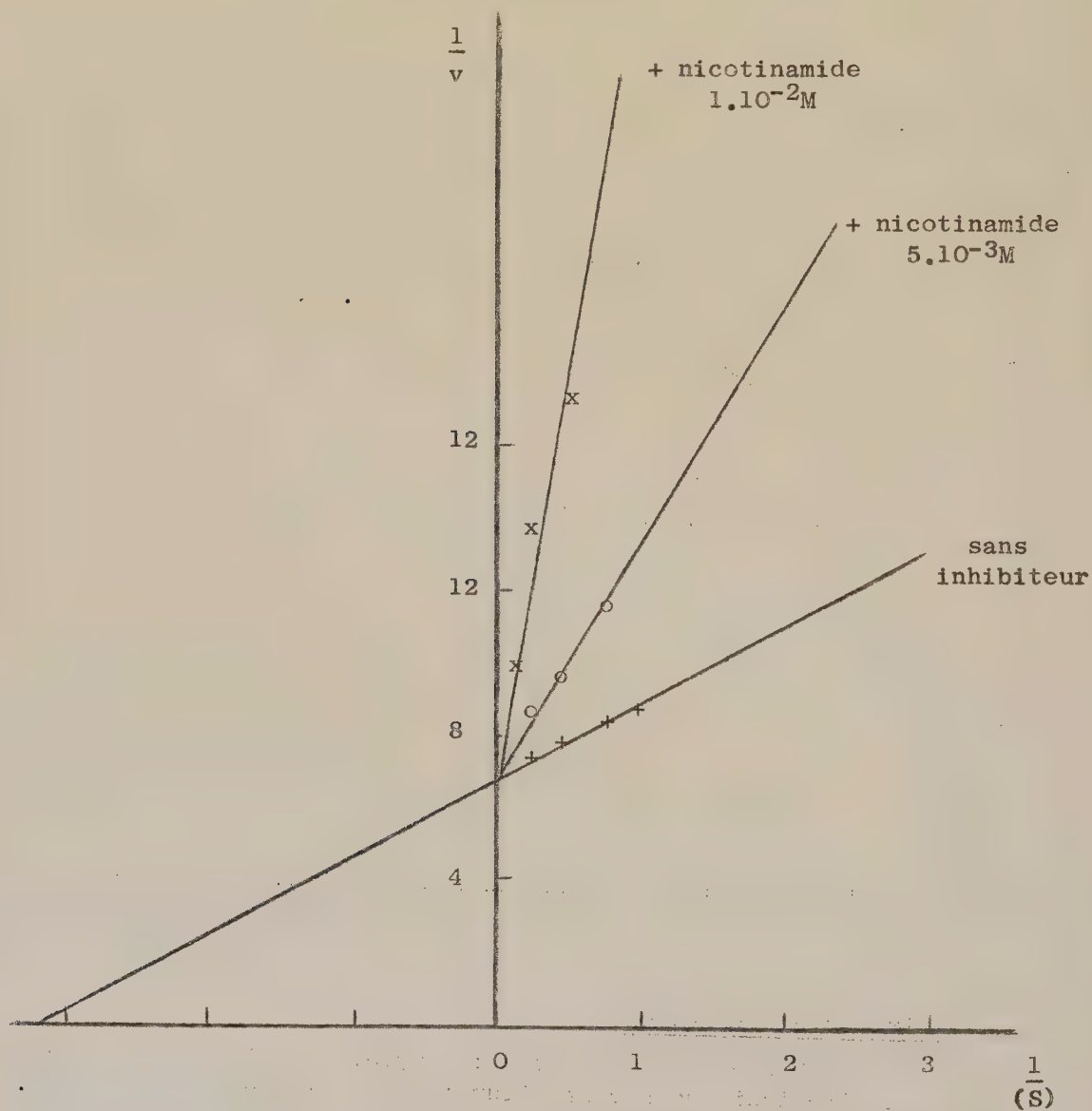
Chaque essai comporte : enzyme, 68 unités; DPN et nicotinamide en quantité indiquée sur la figure; tampon Tris-maléique, pH 7.5, 60 60 µmoles. Volume final 1 ml.

Incubation de 1 min à 37°.

Arrêt et dosage par addition de cyanure.

Figure 19

Inhibition compétitive de la pyridine-nucléotidase
par la nicotinamide
en présence de DPN



Pour l'établissement de cette figure, les valeurs de (S) représentent la densité optique au départ et celles de v , la diminution de cette densité optique après 1 min d'incubation.

Influence de la température.

Des incubations effectuées à 0, 15, 20, 25 et 37°, il ressort que la température n'a guère d'influence sur le rapport des des activités DPN-asique et TPN-asique.

Entre 25 et 35°, le Q_{10} est de 1.7.

Tableau XXVII

Activité en fonction de la température
d' incubation

Température	Activité spécifique max.		Rapport des activités
	DPN-asique	TPN-asique	
0	1 300	1 050	1.24
15	2 720	2 090	1.30
20	3 590	2 710	1.32
25	4 730	3 560	1.33
37	9 020	6 900	1.31

Inhibition par les substances apparentées à la nicotinamide.

En présence du DPN à la concentration de $2.5.10^{-4}$ M, l'isonicotinamide $2.5.10^{-3}$ M inhibe 34 p. 100 de l'activité enzymatique; dans les mêmes conditions l'acide 5-fluoro-nicotinamique inhibe 32 p. 100 de l'activité. Ces inhibitions sont du type compétitif.

L'acide isonicotinamique, la N-méthylnicotinamide sont sans action, même à la concentration de 1×10^{-2} M. L'hydrazide de l'acide isonicotinique et son dérivé isopropyl (Marsilid) inhibent 50 p. 100 de l'hydrolyse du DPN et du TPN à la concentration de 1.10^{-3} M; il n'y a pas de formation de dérivé analogue aux pyridine-nucléotides (l'enzyme n'a pas d'activité transglycosidasique). Parmi les autres substances essayées à la concentration 5×10^{-3} M, l'histidine, l'histamine, la phénosafranine sont sans actions sur l'enzyme.

Influence de divers inhibiteurs.

Les ions minéraux, qui inhibent la TPN-ase du foie, sont sans influence sur l'activité de la pyridine-nucléotidase du sperme.

Les ions Ca^{++} , Cu^{++} , Zn^{++} , $\text{Fe}(\text{CN})_6^{---}$ à 1.10^{-3} M et Hg^{++} à 1.10^{-4} M n'ont également aucune action.

Aucune inhibition n'a pu être constatée en présence d'EDTA, de diéthylthiocarbamate à la concentration de 0.04 M. Le p.chloromercuribenzoate (5.10^{-4} M) n'inhibe pas l'enzyme, ce qui indique une absence de groupes -SH fonctionnels dans la molécule.

Les corticoïdes, hydrocortisone, et cortisone, sont sans action sur l'hydrolyse du DPN ou du TPN, tant pour l'enzyme purifiée que pour l'enzyme brute du plasma séminal frais.

Résumé

- 1°) Le sperme de Taureau contient une quantité considérable de pyridine-nucléotidase en solution naturelle.

- 2°) Cette pyridine-nucléotidase n'est pas spécifique, elle hydrolyse le triphosphopyridine-nucléotide comme le diphosphopyridine-nucléotide.

- 3°) L'enzyme purifiée 100 fois par fractionnement au sulfate d'ammonium et chromatographie sur cellulose modifiée n'a pas d'activité transglycosidasique.

- 4°) L'étude cinétique fait ressortir une plus grande affinité de l'enzyme pour le TPN que pour le DPN, bien que la vitesse d'hydrolyse aux fortes concentrations en substrat soit plus élevée en présence du DPN. Cette plus grande affinité pour le TPN est également mise en évidence lors de l'inhibition compétitive de l'activité en présence de nicotinamide : toutes choses égales par ailleurs, il faut deux fois plus de nicotinamide en présence de TPN qu'en présence de DPN pour obtenir la même inhibition.

5°) La pyridine-nucléotidase du sperme a des propriétés très analogues à celles de la pyridine-nucléotidase de Neurospora elle se différencie en cela des autres pyridine-nucléotidasés animales.

Les études décrites rappellent quelques-unes des conditions expérimentales à respecter pour déterminer si l'on se trouve en présence d'une enzyme non spécifique ou de deux enzymes différentes. Les résultats obtenus permettent d'expliquer les conclusions contradictoires des auteurs qui ont étudié la pyridine-nucléotidase des vésicules séminales.

CONCLUSION

=====

Si l'on compare les résultats obtenus au cours de ce travail avec ceux des différents auteurs qui ont étudié les pyridine-nucléotidases, plusieurs remarques peuvent être dégagées.

Les pyridine-nucléotidases se retrouvent dans tous les tissus essayés, indépendamment du lieu de synthèse des pyridine-nucléotides. Les tissus et sécrétions les plus riches en activité enzymatique, cerveau, rate, vésicules séminales et plasma séminal, contiennent une pyridine-nucléotidase non spécifique, qui hydrolyse le DPN et le TPN; les érythrocytes et le foie, lieux de synthèse de ces coenzymes contiennent des enzymes spécifiques, diphosphopyridine-nucléotidase et triphosphopyridine-nucléotidase, mais beaucoup moins actives.

Les travaux de l'école de KAPLAN ont donné une grande importance à l'activité transglycosidasique présentée par certaines PN-ases; les auteurs pensent que cette activité est liée à la synthèse du DPN, à partir d'un analogue naturel, non encore isolé. Cependant, cette activité n'est pas une propriété générale, elle ne dépend pas du tissu considéré mais semble propre à certaines espèces animales; chez les Oiseaux, les Ruminants, les pyridine-nucléotidases sont dépourvues d'activité transglycosidasique.

Si l'on ajoute encore les observations de NEMETH et DICKERMAN (1960), selon lesquels le fœtus des Mammifères contient du DPN avant que l'activité DPN-asiqque soit détectable, il est difficile d'inclure les pyridine-nucléotidases dans le groupe des enzymes qui contribuent à effectuer la synthèse du DPN et du TPN.

Il est intéressant de noter que GROSSMAN et KAPLAN (1958) ont mis en évidence, dans le sang humain, un cofacteur de la nicotinamide-riboside phosphorylase; ce cofacteur a été scindé en deux parties par chromatographie, l'une d'entre elles est identique à l'ergothionéine, l'autre est une substance probablement voisine. L'ergothionéine, qui, chez les Mammifères, se trouve surtout dans les érythrocytes et le plasma séminal, possède la curieuse propriété de "sensibiliser" à la nicotinamide, la pyridine-nucléotidase de Neurospora. KAPLAN et coll. ont signalé que cette PN-ase est particulièrement difficile à inhiber par la nicotinamide; or en présence de l'ergothionéine, l'enzyme est inhibée par la nicotinamide et les réactions d'échange deviennent possibles, on retrouve du DPN radioactif si la nicotinamide est marquée. En présence d'ergothionéine et de nicotinamide, je n'ai pas retrouvé une inhibition semblable de la PN-ase du plasma séminal, mais il est possible qu'un autre cofacteur puisse jouer le rôle de l'ergothionéine et intervenir dans le contrôle du mécanisme de dégradation des pyridine-nucléotides.

La nécessité d'éventuels cofacteurs n'est pas entièrement hypothétique puisque dans le cas de la triphosphopyridine-nucléotidase du foie, il a été possible de le mettre en évidence. Le cofacteur est-il spécifique de la TPN-ase ou bien est-il nécessaire à toutes les PN-ases? Les résultats décrits montrent que malgré une meilleure purification de la PN-ase du plasma séminal, la présence d'un cofacteur n'a pu être constatée. On peut donc provisoirement admettre qu'il est spécifique de la TPN-ase; seule l'étude plus avancée des propriétés de ce cofacteur permettra de vérifier si, dans le cas des autres enzymes, il n'est pas lié fermement à la protéine enzymatique.

Un rapprochement s'impose par ailleurs entre la TPN-ase, la glutathionase (BINKLEY, 1961) et la thiaminase (1). Il a été possible, pour ces deux dernières enzymes de montrer la rôle de certains activateurs. Ces activateurs sont en fait des accepteurs d'une partie de la molécule scindée; ainsi la glycyl-glycine, la méthionine

(1) FUJITA et Coll. (1952)

acceptent le reste glutamyl libéré par l'action de la glutathionase sur le glutathion et l'aniline accepte le reste thiazol libéré par l'action de la thiaminase sur la thiamine. L'activateur de la TPN-ase pourrait, par analogie, être un accepteur de la nicotinamide libérée ou du reste diphosphoadénosine-ribose. Nous revenons par là à l'activité transglycosidasique, mais en présence d'un accepteur naturel, différent de ceux utilisés par les expérimentateurs.

Un dernier point, relatif à l'action des corticostéroïdes reste à examiner.

Tout au début de ce travail, nous avons vu que la cortisone ou l'hydrocortisone, permettent une plus grande accumulation du TPN dans un extrait brut de poudre acétonique de foie, enrichi en DPN et ATP; puis nous avons vu que la dégradation du TPN formé est inhibée par ces stéroïdes. Ce fait m'a amené à isoler la TPN-ase, mais pour ce qui est de l'action de l'hydrocortisone et de la cortisone, il reste beaucoup à éclaircir : la DPN-kinase purifiée n'est plus stimulée et la TPN-ase, même partiellement purifiée n'est plus inhibée. L'action de l'hormone ne se situe donc pas au niveau de ces enzymes, à moins que l'extrait brut de foie transforme l'hydrocortisone et la cortisone en une autre substance active. Effectivement, des expériences préliminaires confirment cette possibilité; elles conduisent à examiner encore plus loin, parmi les produits de transformation des corticostéroïdes.

Par cette voie, il sera probablement possible de retrouver le mode d'action de l'hydrocortisone et de préciser le mécanisme qui contrôle le métabolisme du TPN et du DPN.

B I B L I O G R A P H I E

=====

- ALIVISATOS S.G.A et DENSTEDT O.F., 1952.- Nicotinamide inhibition of tri- and diphosphopyridine nucleotide-linked deshydrogenases
- J. Biol. Chem., 199, 493 - 504.
- ALIVISATOS S.G.A., KASHKET S. et DENSTEDT O.F., 1956.- The metabolism of the erythrocyts. IX Diphosphopyridine nucleotidase of erythrocyts.
- Cand. J. Biochem. and Phys., 34, 46 - 60.
- ALIVISATOS S.G.A, UNGAR F., LUKACKS L. et LAMANTIA L., 1960.- Imidazolytic Processes. III Enzymic conversion of coenzyme I to a histamine dinucleotide
- J. Biol. Chem., 235, 1742 - 1750.
- ALIVISATOS S.G.A et WOOLLEY D.W., 1955.- Formation of a new dinucleotide from cozymase by enzymatic destruction of the "onium" linkage.
- J. Am. Chem. Soc., 77, 1065 - 1067.
- ALIVISATOS S.G.A et WOOLLEY D.W., 1956.- Solubilisation and purification of the diphosphopyridine nucleotidase from beef spleen
- J. Biol. Chem., 219, 823 - 832.
- BADDILEY J., 1955.- Chemistry of Nucleosides and Nucleotides.
- In CHARGAFF E. et DAVIDSON J.N.: The nucleic acids. New York., tome I, 137 - 190. (1955).
- BARFOED, 1881.- Qualitativen Analyse. In Lehrbuch der Organischen. (Copenhagen). p. 192 - 226.
- BINKLEY F., 1961.- Purification and Properties of renal glutathionase
- J. Biol. Chem., 236, 1075 - 1082.
- BISHOP C., RANKINE D. et TALBOTT H., 1959.- The nucleotides in normal human blood.
- J. Biol. Chem., 234, 1233 - 1237.

- BUCHER N.L.R., Mc GOVERN N.H. KINGSTON R. et KENNEDY M.H., 1953
Factors affecting biosynthesis of cholesterol from
acetate by rat liver homogenates.
- Federation Proc., 12, p. 184
- COLOWICK S.P., KAPLAN N.O. et CIOTTI M.M., 1951.- The reaction of
pyridine nucleotide with cyanide and its analytical use
- J. Biol. Chem., 191, 447 - 459.
- DIXON M., 1953.- The determination of enzyme inhibitor constants.
- Biochem. J., 55, 170 - 171.
- BADIE G.S., 1942. The inhibition of cholinesterase by physostigmine
and prostigmine.
- J. Biol. Chem., 146, 85 - 93.
- (von) EULER H. et ADLER E., 1938.-Über die gegenseitige enzymatische
um wandlung von Codehydrase I und Codehydrase II.
- Z. Physiol. Chemie 252, 41 - 48.
- (von) EULER H. ADLER E., GUNTHER J. et HELLSTROM H., 1937.- Cozymase
das wasserstoffübertragende Co-Enzym bei der Muskel -
Glycolyse.
- Hoppe Seyler's. Z.. Physiol. Chem., 245, 217 - 245.
- (von) EULER H., et HEIWINKEL H., 1937.- Enzymatische inaktivierung der
Cozymase.
- Naturwissenschaften, 25, p. 269.
- (von) EULER H. et SCHLENK F., 1937.- Co-Zymase.
- Z. Physiol. Chemie, 246, 64 - 82.
- (von) EULER H. et VESTIN R., 1938.- Versuche über enzymatische Umwand-
lung der Codehydrase I, in Codehydrase II.
- Arkiv. Kemi. Mineral Geol, 12, 1 - 9.
- FUJITA A., NOSE Y., KOSUKA S., TASHIRO T., VEDA K., et SAKAMOTO S., 1952.-
I Activation of thiamine breakdown by organic bases.
- J. Biol. Chem., 196, 289 - 296. (Studies on thiaminase).
- FUJITA A., NOSE Y., KOSUKA S. TASHIRO T., VEDA K., et SAKAMOTO S. 1952
Studies on thiaminase. II. The base exchange reaction of
thiamine.
- J. Biol. Chem., 196, 297 - 303.
- GLOCK G.E. et Mc LEAN P., 1957.- Levels of oxidized and reduced diphos-
phopyridine nucleotide and triphosphopyridine nucleotide in
humours.
- Biochem. J., 65, 413 - 416.
- GROSSMAN L. et KAPLAN N.O., 1958.- Nicotinamide riboside phosphorylase
from human erythrocyts. I. Phosphorolytic activity.
- J. Biol. Chem., 231, 717 - 726.
- _____ 1958.- Nicotinamide riboside phosphorylase
from human erythrocyts. II. Nicotinamide sensivity.
- J. Biol. Chem., 231, 727 - 740.

- HANDLER P. et KLEIN J.R., 1942.- The inactivation of pyridine nucleotides by animal tissues in vitro.
- J. Biol. Chem., 143, 49 - 57.
- HANDLER P. et KLEIN J.R., 1942.- The inactivation of pyridine nucléotides by animal tissues in vitro.
- J. Biol. Chem., 144, 453 - 454.
- HANDLER P. et KOHN H.I., 1943.- The mechanism of cozymase synthesis in the human erythrocyts : a comparison of the rôles of nicotinic acid and nicotinamide.
- J. Biol. Chem., 150, 447 - 452.
- HARDEN A. et YOUNG W.J., 1906. The alcoholic ferment of yeast-juice
- Proc. Roy. Soc. (London), B 77, 405 - 420.
- HARDEN A. et YOUNG W.J., 1906.- The alcoholic ferment of yeast-juice II The coferment of yeast-juice.
- Proc. Roy. Soc. (London), B 78, 369 - 375.
- HENRI V., 1903.- Les lois générales de l'action des diastases. Thèse de Sciences naturelles. Paris.
- HOFMANN E.C.G., 1957 b.- Darstellung einer DPN-spezifischen nucléosidase aus Erythrozyten.
- Naturwissenschaften, 44, 261 - 262.
- HOFMANN E.C.G., 1957 a.- DPN und TPN spezifische Nucleotidasen in Erythrocyten. I Specificität und Reinigung der Enzyme
- Biochem. Z., 329, 428 - 436.
- HOFMANN E.C.G. et RAPOPORT S., 1957.- DPN und TPN Spezifische Nucleotidasen in Erythrocyten. II. Eigenschaften und Hemmbarkeit der gereinigten Enzyme.
- Biochem. Z., 329, 437 - 448
- HOLMAN W.I.M., 1954.- A colorimetric method for the determination of the principal metabolites of nicotinic acid in human urine.
- Biochem. J., 56, 513 - 520.
- HORECKER B.L. et KORNBERG A., 1948.- The extinction coefficients of the reduced band of pyridine nucleotides.
- J. Biol. Chem., 175, 385 - 390.
- HUGUES N.A., KENNER G.W. and Sir Alexander TODD., 1957.- Coenzyme dehydrogenases. Part III. A synthesis of diphosphopyridine nucleotide (cozymase), and some observations on the synthesis of triphosphopyridine nucleotide....
- J. Chem. Soc., 3733.3738.
- HURST R.O. et BUTLER G.C., 1951.- The chromatographic separation of phosphatases in snake venoms.
- J. Biol. Chem., 193, 91 - 96.

- JOHNSON M.J., 1949.- A rapid micromethod for estimation of non-volatile organic matter.
- J. Biol. Chem., 181, 707 - 711.
- KAPLAN N.O. et CIOTTI M.M., 1954.- The 3-acétylpyridine analog of DPN.
- J. Am. Chem. Soc., 76, 1713 - 1714.
- KAPLAN N.O. et CIOTTI M.M., EYS J.V. BURTON R.M., 1959. Effect of pyridine derivatives on animal tissue. Siphosphopyridine nucléotidases.
- KAPLAN N.O. et CIOTTI M.M., STOLZENBACH F.E. et BACHUR N.R., 1955. Isolation of a DPN isomer containing nicotinamide riboside in the α -linkage.
- J. Am. Chem. Soc., 77, 815 - 816.
- KAPLAN N.O., COLOWICK S.P., CIOTTI M.M., 1952.- Enzymic deamination of adenosine derivatives.
- J. Biol. Chem., 194, 579 - 591.
- KAPLAN N.O., COLOWICK S.P. et NASON A., 1951.- Neurospora diphosphopyridine nucleotidase.
- J. Biol. Chem., 191, 473 - 483.
- KAPLAN N.O. et STOLZENBACH F.E., 1955.- Preparation of DPN derivatives and analogs.
In Méthods in Enzymology (Academic Press, N.Y.), vol. III, 899 - 902.
- KARRER P., KAHN F.W. et Van BERGEN J., 1938.- Weitere Beobachtungen über das Verhalten quartärer salze cyclischer Basen gegen $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$.
- Helv. Chim. Acta, 21, 1174 - 1180.
- KARRER P., KAHN F.W., EPSTEIN R. et JAFFÉ W., 1938.- Weitere untersuchungen über das Verhalten quartärer Pyridiniumsalze und quartärer salze anderer cyclischer Basen gegen Natriumhyposulfit $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$.
- Helv. Chim. Acta, 21, 223 - 236.
- KARRER P., et WARBURG O., 1936.- Jodmethylat des Nicotinsäureamids.
- Biochem. Z., 285, 297 - 298
- KEILIN D. et HARTREE E.F., 1938.- On the mechanism of the decomposition of Hydrogen peroxyde by Catalase.
- Proc. Roy. Soc. (London) B 124, 397 - 405.
- KYHM J.X., DOHERTY D.G., VOLKIN E. et COHN W.E., 1953.- The identification of the isomeric adenylic acids-a and b as the 2'- and 3'-adenosine phosphates, respectively.
- J. Am. Chem. Soc., 75, 1262 - 1263.
- KINSKY S.C., STADTMAN E.R., MACLAY H.K., 1961.- Cofactor Requirements for Pyridine Nucleotide reduction by Hydrogen.
- J. Biol. Chem., 236, 574 - 579.

- KOHN H.I. et KLEIN J.R., 1940.- Synthesis of factor V (pyridine nucleotides) from nicotinic acid in vitro by human erythrocytes.
- J. Biol. Chem., 135, 685 - 689.
- KONIG W., 1904.- LXIX Über eine neue vom Pyridin derivierende Klasse von Farbstoffen.
J. prakt. Chem., 64, 105 - 137.
- KORKES S., del CAMPLIO A. et OCHOA S., 1950.- Biosynthesis of dicarboxylic acids by carbon dioxide fixation. IV Isolation and properties of an adaptive "malic" enzyme from *Lactobacillus arabinosus*.
- J. Biol. Chem., 187, 891 - 905.
- KORNBERG A., 1950.- Enzymatic synthesis of triphosphopyridine nucleotide.
J. Biol. Chem., 182, 805 - 813.
- KORNBERG A., 1950 b.- Reversible enzymatic synthesis of diphosphopyridine nucleotide and inorganic pyrophosphate.
- J. Biol. Chem., 182, 779 - 793.
- KORNBERG A. et PRICER W.E. Jr, 1950 a.- Nucleotide pyrophosphatase.
- J. Biol. Chem., 182, 763 - 778.
- KORNBERG A. ET PRICER W.E. Jr, 1950 b.- On the structure of Triphosphopyridine nucleotide.
- J. Biol. Chem., 186, 557 - 567.
- KREBS H.A. et JOHNSON W.A., 1937.- Metabolism of ketonic acids in animal tissues.
- Biochem. J. 31, 645 - 660.
- LAMBOG M., STOLZENBACH F.E. et KAPLAN N.O., 1958.- The nicotinic analog of diphosphopyridine nucleotide.
- J. Biol. Chem. 231, 685 - 694.
- LANGAN T.A. Jr et SHUSTER L., 1958.- Pyridine nucleotides formed during in vivo synthesis of DPN in the mouse.
- Federation Proc., 17, p. 260.
- LANGDON R.G., 1957.- The biosynthesis of fatty acids in Rat liver.
- J. Biol. Chem., 615 - 629. (226)
- LEHNINGER A.L., 1951.- Phosphorylation coupled to oxydation of dihydrodiphosphopyridine nucleotide
- J. Biol. Chem., 190, 345 - 359.
- LENNERSTRAND A., 1936.- Über die Inaktivierung der Cozymase in mit Fluorid vergiftetem Ap₅ - Zymasesystem und die Bedeutung dieses Vorganges.
Biochem. Z. 287, 172 - 188. Université de Stockholm.
- LEONE E. et BONADUCE L., 1959.- Soluble pyridine nucleotide nucleotidase from seminal vesicles.
- Biochem. Biophys. Acta, 31, 292 - 293.

LINEWEAVER H. et BURK D., 1934.- The determination of Enzyme dissociation constants.

- J. Am. Chem. Soc., 56, 658 - 666.

LUBOCHINSKY B., 1958.- Mise en évidence d'un facteur indispensable à l'activité de la triphosphopyridine-nucléotidase.

C.R. Acad. Sc., 246, 2060 - 2062.

LUBOCHINSKY B. et STOLKOWSKI J., 1957.- Inhibition in vitro de l'hydrolyse enzymatique du triphosphopyridine-nucléotide par la cortisone.

- C.R. Acad. Sc., 244, 952 - 954.

LUBOCHINSKY B. et ZALTA J.P., 1954.- Microdosage colorimétrique de l'azote ammoniacal.

- Bull. Soc. Chim. Biol., 36, 1363 - 1366.

Mc ILWAIN H., 1949.- Cozymase degradation and the control of carbohydrate metabolism in brain.

- Proc. Biochem. Soc., XXXIII - XXXIV 1949.

Biochem., 44, XXXIII - XXXIV.

Mc ILWAIN H., 1950.- Properties of preparations from the central nervous system which degrade coenzymes I and II; their connexion with carbohydrate metabolism.

- Biochem. J., 46, 612 - 619.

Mc ILWAIN H. et RODNIGHT R., 1949.- Breakdown of cozymase by a system from nervous tissue.

- Biochem. J., 44, 470 - 477.

Mc ILWAIN H. et RODNIGHT R., 1942 b.- Breakdown of the oxidized forms of coenzymes I and II by an enzyme from the nervous system.

- Biochem. J., 45, 337 - 342.

MALKIN A. et DENSTEDT O.F., 1956.- The metabolism of the erythrocyte. XI. Synthesis of diphosphopyridine nucleotide in the erythrocyte.

MALKIN A. et DENSTEDT O.F., 1956. The metabolism of the erythrocyte XII. Diphosphopyridine nucleotide nucleotidase of the rabbit erythrocyte.

- Canad. J. Biochem. Physiol., 34, 141 - 145.

MANN P.J.G. et QUASTEL J.H., 1941.- Nicotinamide, cozymase and tissue metabolism.

- Biochem. J., 35, 502 - 517. (même titre note dans Nature, 147, 326 - 327)

_____, 1941.- Nicotinamide, cozymase and tissue metabolism.

- Nature, 147, 326 - 327. (Développé dans Biochem. J., 35, 502 - 517).

- MEHLER A.H., HORNBERG A., GRISOLA S. et OCHOA S., 1948.- The enzymatic oxydation - reductions between malate or isocitrate and pyruvate.
- J. Biol. Chem., 174, 961 - 977.
- MEYERHOF O., OHLMEYER P. et MOHLE W., 1938.- Über die Koppelung zwischen Oxydoreduktion und Phosphatveresterung bei der anaeroben Kohlenhydratspaltung. II Die Koppelung als gelichgewichtsreaktion
Biochem. Zeitschr., 297, 113 - 133.
- MORTON R.K., 1955.- Methods of extraction of Enzymes from animal tissues
- In Methods in Enzymology (Academix Press, N.Y.)
vol. I, 25 - 51.
- MYRBACH K., 1933.- Cozymase und Phosphatase.
- Z. physiol. Chem., 217, 249 - 252.
- NASON A., KAPLAN N.O. et COLOWICK S.P., 1951.- Changes in enzymatic constitution in Zinc deficient neurospora.
- J. Biol. Chem., 188, 397 - 406.
- NEGELEIN E. et GERISCHER W., 1936.- Verbesserte Method zur Gewinnung des Zwischenferments aus Hefe.
- Biochem. Zeitsch. 284, 290 - 296.
- NELSON N., 1944.- A photopetric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose.
- J. Biol. Chem., 153, 375 - 380.
- NEMETH A.M. et DICKERMAN H., 1960.- Pyridine nucleotides and diphosphonucleotidase in developin mammalian tissues.
- J. Biol. Chem., 235, 1761 - 1764.
- OCHOA S., 1948.- Biosynthesis of tricarboxylic acids by carbon dioxide fixation. III Enzymatic mechanisms.
- J. Biol. Chem., 174, 133 - 157.
- OCHOA S., MEHLER A.H. et KORNBERG A., 1948.- Byosynthesis of dicarboxylic acids by carbon dioxide fixation. I Isolation and properties of an enzyme from Pigeon liver catalyzing the reversible oxidative decarboxylation of l-malic acid.
- J. Biol. Chem., 174, 979 - 1000.
- OCHOA S., VEIGA-SALLES J.B., ORTIZ P.J., 1950.- Biosynthesis of dicarboxylic acids by carbon dioxide fixation. III. Enzymatic synthesis of l-malic acid by reductive carboxylation of pyruvic acid.
- J. Biol. Chem., 187, 863 - 874.
- OLSON J.A. et ANFISEN C.B., 1952.- The crystallization and caractérisation of L. glutamic acid dehydrogenase.
- J. Biol. Chem., 197, 67 - 79.
- PREISS J. et HANDLER P., 1957.- Synthesis od diphosphopyridine nucleotide from nicotinic acid by human erythrocytes in vitro.
- J. Am. Chem. Soc., 79, 1514 - 1515.
-

- PREISS J. et HANDLER P., 1957.- Intermediates in the synthesis of diphosphopyridine-nucleotide from nicotinic acid.
- J. Am. Chem. Soc., 79, 4246 - 4247.
- PREISS J. et HANDLER P., 1957.- Enzymatic synthesis of nicotinamide mononucleotide.
- J. Biol. Chem., 225, 759 - 770.
- PULLMANN M.E., SAN PIETRO A., et COLOWICK S.P., 1954.- On the structure of reduced diphosphopyridine nucleotide.
- J. Biol. Chem., 206, 129 - 141.
- QUASTEL J.H. et ZATMAN L.J., 1953.- Effects of extracts of normal tissues and of tumours on yeast fermentation. Estimations of relative diphosphopyridine nucleosidase activities.
- Biochim. Biophys. Acta, 10, 256-267.
- RACKER E., 1950.- Crystalline Alcohol dehydrogenase from Bakers' yeast.
- J. Biol. Chem., 184, 313 - 319.
- REINBERG A. et STOLKOWSKI J., 1957.- Recherches sur le mode d'action de quelques hormones corticostéroïdes sur le potassium cellulaire. II. Relations avec le métabolisme glucidique et l'équilibre acide-base.
- Ann. Endocrinol., 18, 681 - 705.
- REYNOSO A., 1855.- Faits pour servir à l'histoire de la double décomposition saline. Action du glucose sur les sels de Cu en présence des acétates.
- Compt. Rend. Acad. Sc., XLI, p. 278.
- ROAF H.E., 1920.- An improved form of Barfoed's reagent.
- Proc. Physiol. Soc., LX-LXI, in J. Physiol., 54 (1920)
- ROCKSTEIN M. et HERRON P.W., 1951.- Colorimetric determination of inorganic phosphate in microgram quantities.
- Analyt. Chem., 23, 1500 - 1501.
- ROWEN J.W. et KÖRNBERG A., 1951.- The phosphorolysis of nicotinamide riboside.
- J. Biol. Chem., 193, 497 - 507.
- SANADI D.R., 1952.- Enzymatic dephosphorylation of triphosphopyridine nucleotide.
- Archiv. Biochem. Biophys., 35, 268-277.
- SCHLENK F., 1942.- Identification of the carbohydrate group in the nicotinamide nucleotides.
- J. Biol. Chem., 146, 619 - 625.
- SCHLENK F. et EULER H., 1936.- Co-zymase.
- Naturwissenschaften, 24, 794-795.
- SCHMIDT G. et THANNHAUSER S.J., 1943.- Intestinal phosphatase.
- J. Biol. Chem., 149, 369-385

- SERLUPI-CRESCENZI G. et BALLIO A., 1957.- Structure of a new pyridine nucleotide isolated from *Penicillium chrysogenum*.
- *Nature*, 180, 1203-1204.
- SOMOGYI M., 1945.- Détermination of blood sugar.
- *J. Biol. Chem.*, 160, 69 - 73.
- SPAULDING M.E. et GRAHAM W.D., 1947.- The enzymatic degradation of cozymase and the inhibitory action of α tocopherol phosphate.
- *J. Biol. Chem.*, 170, 711 - 718.
- STERN J.R., 1957.- Cristalline β hydroxybutyryl dehydrogenase from pig heart.
- *Biochim. and Biophys. Acta*, 26, 448 - 449.
- STOLKOWSKI J. et REINBERG A., 1956.- Recherches sur le mécanisme de quelques hormones corticostéroïdes sur le potassium cellulaire. I. Influence du glucose et de l'acide adénosine triphosphorique (ATP) sur les mouvements du K cellulaire.
- *Ann. Endocrinol.*, 17, 137 - 159.
- STRAUB F.B., 1942.- Reinigung der Apfelsäuredehydrase und die Bedeutung der Zellstruktur in der Apfelsäuredehydratierung.
- *Z. Physiol. Chem.*, 275, 63 - 72.
- SUMNER J.B., 1944.- A method for the colorimetric determination of phosphorus.
- *Science*, 100, 413 - 414.
- TALALAY P., HURLOCK B. et WILLIAMS-ASHMAN H.G., 1958.- On a coenzymatic function of estradiol 17 β .
- *Proc. Nat. Acad. Sc.*, 44, 862 6 884.
- TAUBER H. et KLEINER I.S., 1932.- A method for the determination of monosaccharides in the presence of dissaccharides and its application to blood analysis.
- *J. Biol. Chem.*, 99, 249 - 255.
- TAVERNIER P., 1924.- Que vaut l'emploi de l'acétate de cuivre comme réactif différentiel du glucose et du lactose.
- Thèse d'Université de Paris (Pharmacie).
- TODD A., 1958. - Studien auf dem Gebiete der Nucleotid Synthese.
- *Angew. Chem.*, 70, 527 - 531.
- UDENFRIED S. et COOPER J.R., 1952.- The enzymatic conversion of phenylalanine to tyrosine.
- *J. Biol. Chem.*, 194, 503 - 511.
- VEIGA-SALLES J.B. et OCHOA S., 1950.- Biosynthesis of dicarboxylic acids by carbon dioxide fixation. II. Further study of the properties "malic" enzyme of Pigeon liver.
- *J. Biol. Chem.*, 137, 849 - 862.

- WAKIL S.J. et GANGULY J., 1959.- On the mechanism of fatty acid synthesis.
- J. Am. Chem. Soc., 81, 2597-2598.
- WANG T.P., 1953.- Phosphokinases for synthesis of triphosphopyridine nucleotide and coenzyme A in pigeon liver.
- Federation Proc., 12, p.286.
- WANG T.P. et KAPLAN N.O., 1954.- Kinases for the synthesis of coenzyme A and triphosphopyridine nucleotide.
- J. Biol. Chem., 206, 311 - 325.
- WARBURG O. et CHRISTIAN W., 1931.- Über Aktivierung der Robisinschen Hexose-mono-phosphosäure in roten Blutzellen und die Gewinnung aktivierender Fermentlösungen.
- Biochem. Zeitschr., 242, 206 - 227.
- WARBURG O. et CHRISTIAN W., 1934.- Co-fermentproblem.
- Biochem. Zeitschr., 274, 112-116.
- WARBURG O. et CHRISTIAN W., 1934.- Co-fermentproblem.
- Biochem. Zeitschr., 275, 112-113.
- WARBURG O. et CHRISTIAN W., 1935.- Co-fermentproblem.
- Biochem. Zeitschr., 275, p.464.
- WARBURG O. et CHRISTIAN W., 1936.- Pyridin der Wasserstoffübertragende Bestandteil von Gärungsfermenten (Pyridine-nucleotide).
- Biochem. Zeitschr., 287, 291 - 328.
- WARBURG O., CHRISTIAN W., et GRIESE A., 1935.- Wasserstoffübertragendes Co-ferment seine Zusammensetzung und Wirkungsweise.
- Biochem. Zeitschr., 279, 157 - 205.
- WARBURG O. et CHRISTIAN W., 1941.- Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Enolase.
- Biochem. Zeitschr., 310, 384 - 421.
- WARBURG O., CHRISTIAN W. et GRIESE A., 1935.- Die Wirkungsgruppe des Co-ferments aus roten Blutzellen.
- Biochem. Zeitschr., 279, 143 - 144.
- ZATMAN L.F., KAPLAN N.O. et COLOWICK S., 1953.- Inhibition of spleen diphosphopyridine nucleotidase by nicotinamide an exchange reaction.
- J. Biol. Chem., 200, 197 - 212.
- ZATMAN L.J., KAPLAN N.O. et COLOWICK S.P., 1954.- The isolation and properties of the isonicotinic acid hydrazide analogue of diphosphopyridine nucleotide.
- J. Biol. Chem., 209, 467 - 484.
- ZATMAN L.J., KAPLAN N.O., COLOWICK S.P. et CIOTTI M.M., 1954 b.- Effect of isonicotinic acid hydrazide on diphosphopyridine nucleotidases.
- J. Biol. Chem., 209, 453 - 466.

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

" Biosynthèse des nucléotides puriques "

Vu et approuvé :

Paris, le 29 Mai 1961

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

J. PERES

Vu

et Permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

Jean SARRAILH

